

Aus der 1. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Johannes - Gutenberg - Universität Mainz

UNTERSUCHUNGEN ZUR  
PHARMAKOLOGISCHEN SUPPRESSION DER  
T-ZELLREAKTIVITÄT ANHÄND DER GRAFT-  
VERSUS-HOST-REAKTION BEI DER MAUS

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin  
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz  
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Sabine Köckler

aus Markkleeberg

Mainz

1979







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

Aus der 1. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Johannes - Gutenberg - Universität Mainz

UNTERSUCHUNGEN ZUR  
PHARMAKOLOGISCHEN SUPPRESSION DER  
T-ZELLREAKTIVITÄT ANHAND DER GRAFT-  
VERSUS-HOST-REAKTION BEI DER MAUS

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin  
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz  
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Sabine Köckler

aus Markkleeberg

Mainz

1979



Fachbereichsdekan : Prof. Dr. Straub

1. Gutachter : Prof. Dr. Lemmel

2. Gutachter : Prof. Dr. H. Schulte-Wissermann

## GLIEDERUNG

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| 1. Einleitung                                                | 1  |
| 2. Experimenteller Teil                                      | 15 |
| 2.1. Material und Methoden                                   | 15 |
| 2.1.1. Versuchstiere                                         | 15 |
| 2.1.2. Herstellung der Zellsuspension                        | 15 |
| 2.1.3. Injektionen                                           | 15 |
| 2.1.4. Medikament                                            | 16 |
| 2.1.5. Auswertung der Ergebnisse                             | 17 |
| 2.1.5.1. Einteilung der Versuchsgruppen                      | 17 |
| 2.1.5.2. Bestimmung der Organveränderung nach Simonsen       | 17 |
| 2.1.5.3. Statistische Auswertung                             | 18 |
| 2.2. Ergebnisse                                              | 19 |
| 2.2.1. Konventionelles g-v-h-Modell<br>Überlebenszeitmessung | 19 |
| 2.2.2. Konventionelles g-v-h-Modell<br>Organindexmessung     | 22 |
| 2.2.3. Die Modifikation des g-v-h-Modells                    | 25 |
| 3A Zelltransfer 7 Tage nach Vorbehandlung                    | 29 |
| 3B Zelltransfer 10 Tage nach Vorbehandlung                   | 32 |

|        |                                                 |    |
|--------|-------------------------------------------------|----|
| 3C     | Zelltransfer 14 Tage nach Vorbehandlung         | 34 |
| 3D     | Zelltransfer 17 Tage nach Vorbehandlung         | 34 |
| 3E     | Zelltransfer 20 Tage nach Vorbehandlung         | 37 |
| 3F     | Zelltransfer 30 Tage nach Vorbehandlung         | 37 |
|        | Diskussion                                      | 40 |
| 2.2.4. | Modifiziertes g-v-h-Modell                      |    |
|        | T-Zellhemmung in Abhängigkeit von Antigendosis  | 42 |
| 2.2.5. | Modifiziertes g-v-h-Modell                      |    |
|        | Medikament zum Vergleich: Azathioprin           | 45 |
| 2.2.6. | Modifiziertes g-v-h-Modell                      |    |
|        | Vorimmunisierung mit Schafererythrozyten (SRBC) | 49 |
| 2.2.7. | Modifiziertes g-v-h-Modell                      |    |
|        | Antigenspezifität der T-Zellhemmung bei         |    |
|        | genetischer Differenz des Empfängertieres       | 54 |
| 3.     | Diskussion                                      | 60 |
| 3.1.   | Zur graft-versus-host-Reaktion                  | 60 |
| 3.2.   | Zur medikamentösen Beeinflussung                | 65 |
| 3.3.   | Zur Antigenspezifität der T-Zellhemmung         | 69 |
| 4.     | Zusammenfassung                                 | 72 |
| 5.     | Literaturverzeichnis                            | 75 |

## 1. EINLEITUNG

Das immunologische System des Menschen dient der Individualitätserhaltung des Organismus durch Abwehr körperfremder Stoffe.

Ogleich es eines der wichtigsten Funktionssysteme des menschlichen Körpers ist, sind unsere Kenntnisse von seiner Physiologie, Morphologie, Pathophysiologie und den Möglichkeiten der therapeutischen Beeinflussung noch gering und ungenau.

Zwei Beispiele aus dem klinischen Bereich mögen dies belegen: Zum einen wünschen wir, bei Organtransplantationen die physiologische Abwehrreaktion gegen das Transplantat zu unterdrücken, ohne zum Beispiel die Abwehrleistung gegen Infektionen zu beeinträchtigen, zum anderen suchen wir bei Autoimmunkrankheiten nach den pathophysiologischen Abläufen und versuchen, sie mit Pharmaka zu korrigieren.

So gilt ein besonderes Interesse, die Kenntnisse der therapeutischen Einflußmöglichkeiten und vor allem der physiologischen Grundmechanismen zu erweitern.

# ZWEITEILUNG DES IMMUNSYSTEMS

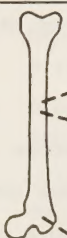
| INKOMPETENZ<br>(Stammzellen)                                                      | durch Induktion →                                                                   | KOMPETENZ                    |                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Knochenmark,<br>foetale Leber                                                     | Lymph. Organe<br>I. Ordnung                                                         | Lymph. Organe<br>II. Ordnung | Funktion                                                                                                                                         |
|  | Thymus                                                                              | Milz<br>z.B.<br>Lymphkn.     | <b>T-System</b><br>"zelluläre" Immunität<br>a) Transpl. Abst.<br>b) verz. Reaktion<br>c) antibakt. und<br>antivirale Abwehr<br>d) g-v-h Reaktion |
|                                                                                   | Bursa Fabricii<br>(Äquivalent)<br><br>Granulozyten<br>Megakaryozyten<br>Makrophagen |                              | <b>B-System</b><br>"humorale" Immunität<br>Immunglobuline<br><br>Ig M<br>Ig G<br>Ig A (?)<br>Ig E (?)                                            |

Abb. 1:

Schematische Darstellung der funktionellen Zweiteilung des Immunsystems. - Immunologisch inkompetente Stammzellen erlangen unter dem Einfluß von Thymus oder Bursa Fabricii (bzw. deren Äquivalent) die Fähigkeit zur spezifischen Antigenerkennung. Sie bilden nun als spezifisch antigen-reaktive Zellen des T- oder des B-Systems einen Teil der lymphoiden Zellen des lymphatischen Apparates sowie der peripheren Zirkulation. Sie sind nach Antigenbegegnung in der Lage, mit einer spezifischen Reaktion die Immunantwort zu tragen.

Die physiologischen Grundmechanismen sollen hier nun kurz aufgeführt werden:

Das Immunsystem des Warmblüters setzt sich aus zwei Teilsystemen zusammen, zu deren Funktionsträgern die Lymphozyten des peripheren Blutes und der lymphatischen

Organe gehören. Diese stammen ursprünglich von den undifferenzierten pluripotenten Stammzellen des Knochenmarkes ab. Im Laufe der ontogenetischen Entwicklung erreichen sie ihre funktionelle Zuordnung entweder durch den Einfluß der Bursa Fabricii bzw. deren funktionellen Äquivalent - diese Zellen bezeichnet man nach dem Induktionsorgan als Lymphozyten des "B-Systems" - oder sie reifen unter dem Einfluß des Thymus zu den Lymphozyten heran, die man als "T-Lymphozyten" bezeichnet.

Sowohl die B- wie auch die T-Lymphozyten stehen zur Beantwortung antigener Reize bereit, wobei es vor allem von der Struktur der Antigene abhängt, ob das "B-System" oder das "T-System" reagiert.

Werden B-Zellen von dem zuständigen Antigen aktiviert, so bilden sie sich, gegebenenfalls nach Durchlaufen von Teilungsschritten, in Plasmazellen um. Diese bilden die Immunglobuline der verschiedenen Immunglobulinklassen, die in das Serum abgegeben werden.

Werden T-Zellen von dem für sie zuständigen Antigen aktiviert, so bilden sie sich in aktivierte Lymphozyten um. Diese bringen, biochemisch nicht charakterisierte, zytotoxische Faktoren hervor, die imstande sind, Zielgewebe

(Antigene) zu zerstören. Diese Faktoren werden dann Lymphotoxine genannt. Außerdem wirken T-Zellfaktoren an anderen biologischen Phänomenen mit, z. B. bei der Aktivierung von Makrophagen. Sie heißen dann Lymphokine.

Das "B-System" wird auch humorales System genannt, da alle Funktionen durch Serum auf einen anderen geeigneten Organismus übertragbar sind. Das T-System heißt auch zelluläres System, da sich seine Funktionen nur durch die T-Zellen auf einen anderen geeigneten Organismus übertragen lassen.

In gleicher Weise lassen sich die Phänomene der Allergie vom Soforttyp und Allergie vom verzögerten Typ als Funktion der beiden Systeme zuordnen. Bei der Allergie vom Soforttyp reagiert das Antigen mit den frei im Serum befindlichen zuständigen Antikörpern zu Antigen-Antikörperkomplexen, die dann gemeinsam mit verschiedenen anderen serologischen Faktoren klinisch als Entzündungsreaktion imponieren. Bei der Allergie vom verzögerten Typ werden durch das Antigen die T-Lymphozyten in aktivierte Lymphozyten umgewandelt und aktivieren Makrophagen, die gemeinsam z. B. das Phänomen der verzögerten Hautreaktion (Tuberkulinreaktion) ausmachen.

Als Defekte des B-Systems sind Agammaglobulinämien bekannt, als Hyperfunktionen kommen gegen eigene Körperdeter-

minanten gerichtete "Autoantikörper" vor.

Auch im T-System sind Defektzustände bekannt: Thymus- bzw. Epithelkörperchenaplasie (di-George-Syndrom).

Welches der beiden Systeme in der Leistung angesprochen wird, hängt neben bisher unbekannten Faktoren von der Art des Antigens ab. Bestimmte Antigene aktivieren nur das B-System, andere nur das T-System. Meist wird ein System bevorzugt angesprochen, das andere ist aber an der Gesamtreaktion beteiligt. Dabei ist es bisher weitgehend unbekannt, wie dieser Synergismus funktioniert. Vielfach ist für eine optimale Leistung des einen Systems (z. B. Antikörperbildung) eine Kooperation mit dem anderen System eine Voraussetzung (aktivierte "T-Zellen" helfen B-Zellen = "T-Helferzellen").

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung sollen Möglichkeiten zur Beeinflussung der Immunfunktion, insbesondere des zellulären Systems, untersucht werden. Aus der oben dargestellten Zweiteilung des Immunsystems mit den einzelnen Aufgaben der Teilsysteme ergibt sich, daß es wünschenswert sein kann, die Immunreaktion des einen Teilsystems zu dämpfen, während das andere weitgehend intakt bleibt. Zum Beispiel wäre es bei einer Transplantation sinnvoll, die

zelluläre Immunität, die für die Transplantationsabstoßung hauptsächlich verantwortlich ist, selektiv zu unterdrücken, ohne daß die B-Zellfunktionen gestört werden dürften.

Bisher gibt es keine Möglichkeit, selektiv nur eines der beiden Zellsysteme zu beeinflussen. Immunsuppressiva wirken an sich unspezifisch und unselektiv auf die Multiplikation oder Funktion immunologisch kompetenter Zellen. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen kann eine scheinbare Selektivität der Pharmaka durch vorher verabreichtes Antigen erreicht werden. Dieses führt zur Aktivierung der korrespondierenden kleinen Lymphozyten. Diese aktivierten kleinen Lymphozyten weisen vor allem eine erhöhte Stoffwechselrate auf und sind somit sensibler gegenüber einer Beeinflussung durch Pharmaka als nicht aktivierte Lymphozyten. Unter derartigen Voraussetzungen scheinen Immunsuppressiva selektiv auf Immunvorgänge zu wirken, denn sie hemmen gezielt die Funktion der vorher aktivierten Lymphozyten.

Unter optimalen Experimentalbedingungen gelingt es so, mit Hilfe von Pharmaka die Reaktionsfähigkeit gegenüber bestimmten Antigenen vollständig auszuschalten, ohne das Reaktionsvermögen gegenüber anderen nicht verwandten Antigenen negativ zu beeinflussen. Nur die für das zuständige

Antigen bereitstehenden Lymphozyten werden durch dieses in ihrem Stoffwechsel aktiviert, was sie, im Vergleich zu allen anderen Zellen, gegenüber dem danach gegebenen Pharmakon vulnerabel macht. Diese Zellen werden somit durch das Pharmakon eliminiert ("clonale Ausrottung"), es resultiert der funktionelle Zustand einer antigenspezifischen Nichtreaktivität: immunologische Toleranz.

Auf verschiedenen Stufen der immunologischen Abwehr können spezifische und auch unspezifische Einflußmöglichkeiten benutzt werden:

1. Verhinderung der Entwicklung von immunologisch kompetenten Zellen aus ihren Stammzellen (z. B. Thymektomie und/oder Bestrahlung)
2. Zerstörung immunologisch kompetenter Zellen oder deren Inaktivierung (z. B. durch Antilymphozytenserum oder Bestrahlung)
3. Einwirkung auf die cellulären Reorganisationsvorgänge immunologisch kompetenter Zellen nach Antigenreiz durch Einbau falscher Bausteine (z. B. durch Antimetabolite wie 6-Mercaptopurin, Azathioprin und Methotrexat)
4. Beeinträchtigung der Vermehrung und Differenzierung von stimulierten Zellen, das heißt der Effektorzellen und

der Gedächtniszellen - erhöhte Vulnerabilität gegenüber bestimmten cytotoxischen Substanzen (z. B. alkylierende Verbindungen [Cyclophosphamid, Myleran] und Methylhydrazinderivate).

5. Hemmung der Eiweißsynthese, die zur Bildung von Immunglobulinen nötig sind (z. B. durch Puromycin).

Außerdem müssen noch die Corticosteroide mit mehreren unspezifischen Angriffspunkten im Immunsystem genannt werden.

Sämtliche chemischen Immunsuppressiva können abhängig von der Dosis und der individuellen Verträglichkeit schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen, wie z. B. Pancytopenien, Infektanfälligkeit, Durchfälle, Geschwüre, Haarausfall und Sterilität. Besonders die Knochenmarkshemmung begrenzt die therapeutische Breite und damit ihren klinischen Einsatz.

Ein Medikament, bei dem das Verhältnis der Nebenwirkungen zur wirksamen Dosierung relativ günstig ist, ist das Cyclophosphamid (Endoxan<sup>®</sup>) aus der Gruppe der Alkylantien.

In den vorliegenden Untersuchungen wird eine Weiterentwicklung des Cyclophosphamids, Asta 036.5122, hinsichtlich seiner

immunsuppressiven Wirksamkeit näher untersucht. Dabei sollte insbesondere Aufschluß darüber gewonnen werden, ob und in welcher Weise dieses Präparat zur Hemmung von T-Zellfunktionen geeignet ist. Daß dieses Präparat in der Tat eine ausgeprägte Wirkung auf das humorale System besitzt, und zwar eine stärkere als die Muttersubstanz Cyclophosphamid selbst, wurde von Botzenhardt und Lemmel (7, 8) nachgewiesen.

Während sich Funktion und Beeinflussung des B-Systems durch Bestimmung der Produkte (Antikörper) mit serologischen Meßmethoden gut quantifizieren lassen, sind Funktionen und deren Beeinflussungen im T-System nur indirekt meßbar. Als Testmodelle in vivo dienen z. B. Hauttransplantationen, die Tuberkulinreaktion und die graft-versus-host-Reaktion. Für die Beeinflußbarkeit der T-Zellreaktion haben diese Modelle jedoch jeweils biologische Nachteile: Transplantationsreaktionen sind bei starker genetischer Differenz sehr schwer therapeutisch zu beeinflussen, bei der Tuberkulinreaktion "stört" die starke Makrophagenbeteiligung die Meßbarkeit der T-Zellaktivitäten. Bei der graft-versus-host-Reaktion (g-v-h-Reaktion) kann man nicht differenzieren, ob die gemessenen Veränderungen, besonders die Mortalität, auf der ursprünglichen g-v-h-Reaktion oder auf einer eventuell toxischen Wirkung des applizierten Medikamentes beruhen. Dennoch hat sich dieses Modell nach

Standardisierung mancher Variablen, bei guter Meßbarkeit der T-Zellreaktivitäten, bewährt.

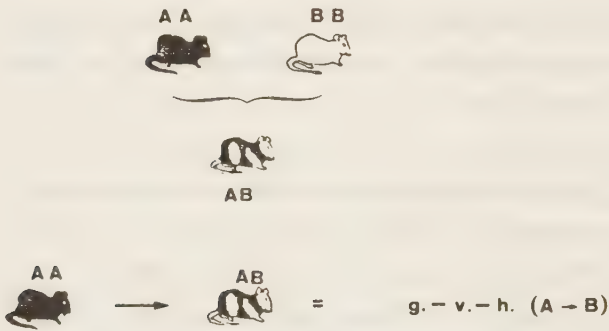


Abb. 2:

Schematische Darstellung der graft-versus-host-Reaktion. - Im oberen Teil die Kreuzungsreaktion der beiden Inzuchtstämme AA und BB zum F<sub>1</sub>-Hybriden AB. Im unteren Teil die Darstellung des Transfers der immunologisch kompetenten Zellen des einen Elternteils (Spender) in den immunologisch inkompetenten F<sub>1</sub>-Hybriden (Wirt). Es resultiert die g-v-h-Reaktion, wobei die A-Komponente des Elternteils gegen die B-Komponente im F<sub>1</sub>-Hybriden reagiert.

Die g-v-h-Reaktion wird hervorgerufen durch die Übertragung immunkompetenter Zellen auf einen genetisch differenten, immunologisch inkompetenten Organismus. Dabei reagieren die übertragenen Zellen (graft-Spender) gegen den Wirtsorganismus (host-Empfänger), siehe Abb. 2. Dessen immunologische Inkompetenz, d. h., seine Unfähigkeit, die

Spenderzellen zu eliminieren, kann durch immunologische Unreife, exogen induziert oder genetisch bedingt sein. Die g-v-h-Reaktion führt zu einer häufig letal endenden Erkrankung des Empfängertieres, der "runt-disease". Die wichtigsten pathologischen Veränderungen bei den Mäusen, die hier als Versuchstiere besonders geeignet erscheinen, sind:

1. Ein starker Gewichtsverlust, der sehr häufig mit starkem Durchfall einhergeht.
2. Splenomegalie, die ca. 10 Tage nach der Zellübertragung ihren Höhepunkt erreicht.  
Zu späteren Zeitpunkten kann es sogar zu einer Milzverkleinerung kommen. Histologisch finden sich neben kleinen Nekrosen Massen von pyroninophilen Zellen und auch proliferierenden Histiozyten in der Milz.
3. Die Lymphozyten hypertrophieren in der Frühphase ebenfalls, später kann man eine Involution bemerken.
4. Der Thymus zeigt eine Involution bis Atrophie.
5. Zunehmende Hepatomegalie, später sind gleichfalls histologisch kleine Nekrosen und proliferierende Histiozyten zu sehen.
6. Ein ruppiges Fell, mit blutigen Exkoriationen versehene Haut, besonders um den Anus herum.

7. Im Blutbild findet sich eine Leukopenie mit Lymphopenie, außerdem häufig eine Anämie.

Die Reaktionen des lymphatischen Systems, die obigen Symptomen wie Splenomegalie, Hepatomegalie, Lymphopenie zugrunde liegen, laufen in zwei Phasen ab. In der ersten verschwinden die normalen Lymphozyten und werden durch sogenannte "pyroninophile" Zellen ersetzt. In der zweiten Phase finden sich Fibrosierung und Atrophie des lymphoiden Gewebes.

Die pyroninophilen Zellen entwickeln sich vermutlich aus der Reihe der übertragenen T-Zellen. Bei den oben beschriebenen Organvergrößerungen, zum Beispiel im Rahmen der Phagozytose und beim Abraum des durch die g-v-h-Reaktion geschädigten Gewebes, sind jedoch sicherlich Empfängerzellen beteiligt; ob darüber hinaus lymphoide Empfängerzellen durch die g-v-h-Reaktion in ihrer Funktion beeinflusst werden und an der Runtkrankheit beteiligt sind, wurde zwar von Simonson (Progr. Allerg. IV S. 413 ff [1962] ) diskutiert, ist jedoch nicht sicher geklärt.

Für das Absterben der an der "runt-disease" erkrankten Tiere findet sich kein eindeutiges pathologisches Korrelat, welches für sich allein den Tod erklärt. Die Tiere geraten in einen allgemeinen Schwächezustand, und da die Immunabwehr vermindert ist, können bakterielle Infektionen

dann letztlich den Tod herbeiführen. Das ist auch daran zu sehen, daß keimfrei gehaltene Tiere die g-v-h-Reaktion länger überleben, bei entsprechender genetischer Differenz zwischen Spender und Empfänger schließlich jedoch ebenfalls an den Folgen der g-v-h-Reaktion sterben. Die Infektion kann somit nicht als alleinige Todesursache angeführt werden.

Das Ausmaß der Organveränderungen bei den Versuchstieren bzw. deren Todesrate hängt von mehreren Faktoren ab. Die drei folgenden haben den größten Einfluß:

Erstens, die genetische Differenz zwischen den Spenderzellen und dem Empfängerorganismus; je größer die genetische Differenz, besonders im H2-Locus, desto stärker auch die Reaktion. Um Variable in diesem Punkt auszuschließen, arbeitet man bei Tierexperimenten mit Inzuchtstämmen mit bekannten genetischen Loci.

Zweitens kommt es auf die Anzahl der übertragenen Zellen an; die pathologischen Veränderungen nehmen mit der Zahl der Spenderzellen zu, allerdings nur bis zu einem gewissen Ausmaß. Oberhalb einer bestimmten Zellzahl sind die Symptome der g-v-h-Reaktion nicht mehr zu steigern. In dieser Arbeit wurde mit Zellzahldosierungen im optimalen Bereich gearbeitet, die maximale Organveränderungen hervorrufen.

Drittens ist das Alter des Empfängertieres von Wichtigkeit; bei gleich starker genetischer Differenz sterben neugeborene Tiere an der g-v-h-Reaktion in einem sehr viel höheren Prozentsatz als Tiere, die bei der Zellübertragung bereits einige Tage oder Wochen alt waren.

So ist die g-v-h-Reaktion bei Beachtung des Standards dieser genannten Parameter ein geeignetes Modell zur Messung einer T-Zellreaktion.

Unter Berücksichtigung der oben dargestellten Kenntnisse und Aspekte der Physiologie des Immunsystemes bzw. seiner Teilsysteme, der Wirkungsweise der Immunsuppressiva und der biologischen Gegebenheiten der Testmodelle des T-Systems, wird im folgenden anhand der graft-versus-host-Reaktion der Wirksamkeitsnachweis eines neuentwickelten Immunsuppressivums, des Cyclophosphamidanalogs Asta O36.5122 auf die T-Zellreaktion der Inzuchtmäuse und ihrer F1-Hybride zu führen versucht.

## 2. EXPERIMENTELLER TEIL

### 2.1. Material und Methoden

- 2.1.1. Versuchstiere: Es wurden Mäuse der Inzuchtstämme C<sub>57</sub>Bl/6, C<sub>3</sub>H und A (aus der Zucht von Gl. Bomholtgard Ltd. Ry, Dänemark) benutzt und deren drei Tage alte F<sub>1</sub>-Hybride aus eigener Zucht. Die genetische Differenz zwischen C<sub>57</sub>Bl/6 und A wie auch zwischen C<sub>3</sub>H und A gilt als stark (H<sub>2</sub>-Locus). Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen gehalten und bekamen Wasser und als Futter Altromin nach Bedarf.
- 2.1.2. Herstellung von Zellsuspensionen: Milzen von erwachsenen Tieren wurden in einem Glas-Teflon-Homogenisator (Braun-Melsungen) vorsichtig homogenisiert, dreimal in 20 ml Ringerlösung unter Zusatz von 1 % Penicillin-Streptomycin suspendiert und gewaschen. Die Vitalität der Zellen wurde durch Färbung mit Trypan-Blau nachgewiesen. Der Anteil der lebenden Zellen nach den Wasch-Schritten betrug ca. 80 %. Die Zellsuspensionen wurden so mit Ringerlösung eingestellt, daß erwachsene Tiere zwischen 80 und 150 Millionen Milzzellen (in 2 ml), Jungtiere 10 Millionen Zellen (in 0,1 ml) pro Gramm Körpergewicht (KG) erhielten.
- 2.1.3. Injektionen: Die Injektionen erfolgten intraperitoneal, wobei bei den jungen Tieren durch die Muskulatur des Ober-

schenkels der Hinterbeine eingestochen wurde und der Rückfluß der Suspension durch den Stichkanal mittels Kompression verhindert wurde. Die Injektionen wurden stets zur gleichen Tageszeit vorgenommen.

2.1.4. Medikament: Es wurde ein neuentwickeltes Cyclophosphamid-analogum der Asta-Werke, Brackwede, mit der Chargennummer 036.5122 untersucht. Chemisch ist es ein 3-(2-Chloräthyl)-2-(2-mesyloxyäthylamino)-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxyd und steht strukturell dem Ifosfamid nahe. Asta 5122 ist in Wasser löslich und lag als Reinsubstanz in pulverisierter Form vor. Das Pulver wurde unmittelbar vor der Injektion in mit 1 % Penicillin-Streptomycin versetzter Ringerlösung aufgelöst und die Konzentration wurde jeweils so eingestellt, daß das Injektionsvolumen bei erwachsenen Tieren stets 0,1 ml/10 g Körpergewicht (KG), bei neugeborenen Tieren 0,1 ml/g KG betrug. Zum Vergleich wurde Azathioprin, ebenfalls als Reinsubstanz in pulverisierter Form, verwendet, das nach Lösung in 0,1 n NaOH, in Ringerlösung (mit 1 %igem Zusatz von Penicillin-Streptomycin) so injiziert wurde, daß das Injektionsvolumen bei erwachsenen Tieren ebenfalls 0,1 ml/10 g KG, bei neugeborenen Tieren 0,1 ml/g KG betrug.

### 2.1.5. Auswertung der Ergebnisse

2.1.5.1. Einteilung der Versuchsgruppen: Die Tiere eines Wurfes wurden den verschiedenen, später im einzelnen beschriebenen Behandlungen unterzogen und durch Markieren der Ohren und des Schwanzes identifizierbar gemacht. Es wurden bei einer Versuchsanordnung Langzeitbeobachtungen durchgeführt. Dabei wurden die Tiere täglich zur gleichen Tageszeit gewogen, die jeweiligen Mittelwerte des Körpergewichts der gleichaltrigen Tiere errechnet und die Absterberate aufgezeichnet.

Bei einer anderen Versuchsanordnung wurden die Jungtiere 10 Tage nach der Zellübertragung gewogen, dann getötet, ausgeblutet und ihre Leber, Milz und Thymus einzeln gewogen und als Organgewichte aufgezeichnet.

2.1.5.2. Bestimmung der Organveränderung nach Simonsen: Die gemessenen Organgewichte wurden in Relation zum Körpergewicht des jeweiligen Tieres gesetzt; das "Relativgewicht" für jedes Organ ergibt sich aus

$$\text{Relativgewicht Leber, Milz, Thymus} = \frac{\text{Organgewicht}}{\text{Körpergewicht}}$$

So ist das Relativgewicht ein Maß für die Größe eines Organs im Verhältnis zum Körpergewicht dieses Tieres. Parallel dazu wird das Relativgewicht eines unbehandelten Kontroll-

tieres bestimmt, das aus dem gleichen Wurf stammt. Als "Organindex" für jedes Versuchstier ergibt sich dann

$$\text{Organindex Leber, Milz, Thymus} = \frac{\text{Relativgewicht}_{\text{Versuchstier}}}{\text{Relativgewicht}_{\text{Kontrolltier}}}$$

Dieser Organindex ist ein Maß für die experimentell induzierte Organveränderung. Damit ist es möglich, das Ausmaß der Organveränderungen bei der g-v-h-Reaktion (z. B. Hepato-Splenomegalie, Thymusinvolution) zu quantifizieren und die unterschiedlichen Organgrößen aufgrund unterschiedlicher Behandlung von Tieren eines Wurfs miteinander zu vergleichen. Dabei zeigt ein Organindex von  $\approx 1$  an, daß sich die Größe des gemessenen Organs des Versuchstieres von derjenigen des Kontrolltieres nicht unterscheidet. Ein Organindex von  $>1$  bedeutet Organvergrößerung, ein Organindex von  $<1$  Organverkleinerung des behandelten Tieres.

2.1.5.3. Statistische Auswertung: Die gewonnenen Organindices für Leber, Milz und Thymus wurden folgendermaßen der statistischen Auswertung zugänglich gemacht: Es wurde von den jeweiligen Organindices 1 abgezogen, um nur den numerischen Wert der Abweichung vom Kontrolltier zu erhalten. Dieser wurde absolut gesetzt und die drei so modifizierten Organindices eines Tieres addiert, so daß man als Ergebnis einen Wert für die Gesamtabweichung der drei Organe

eines Tieres aufgrund der jeweiligen Behandlung erhält (Summenwert). Diese Werte werden für die verschiedenen Behandlungsarten spaltenweise, die Werte eines Wurfes jeweils nebeneinander, notiert. Den nebeneinanderstehenden Werten werden aufsteigende Rangzahlen, bei 1 für den kleinsten Wert beginnend, zugeordnet, und diese werden pro Behandlungsart, also spaltenweise, aufaddiert (rangierte Summenwerte).

## 2.2. Ergebnisse

### 2.2.1. Versuch 1      Konventionelles graft-versus-host-Modell Messung der Überlebenszeit

Neugeborene (C<sub>57</sub>Bl/6xA)-F<sub>1</sub>-Hybride wurden in drei Gruppen unterteilt. Die Gruppe 1 erhielt am dritten Lebenstag 10 Millionen C<sub>57</sub>Bl/6 - Milzzellen pro g KG, Gruppe 2 erhielt vom 4. - 6. Lebenstag 3 x 20 mg Asta 5122/kg KG und Gruppe 3 erhielt am 3. Lebenstag Zellen (wie die Gruppe 1) und anschließend vom 4. - 6. Lebenstag das Pharmakon (wie die Gruppe 2). Die Tiere wurden täglich gewogen und die Todesfälle vermerkt.

Ergebnis: Abb. 3 zeigt im oberen Teil die Absterberate für jede Versuchsgruppe, im unteren Teil sind die Kurven der Körpergewichtsentwicklung wiedergegeben. Die Kontrolltiere wiesen eine fast lineare Gewichtszunahme auf, ein

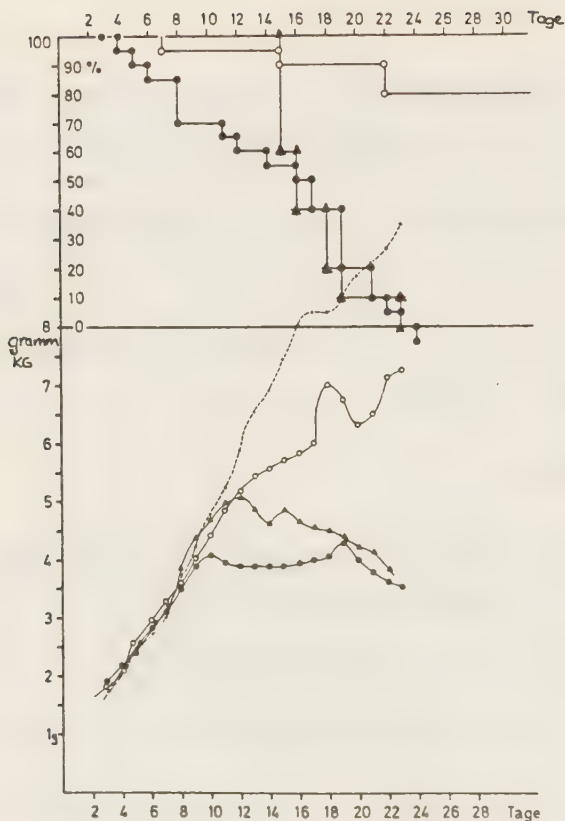


Abb. 3: Konventionelles graft-versus-host-Modell  
Messung der Überlebenszeit

Im oberen Teil ist die Absterberate für die jeweiligen Versuchsguppen in Prozenten angegeben. Dabei galt die Gesamtzahl der benutzten Tiere als 100 %. Im unteren Teil ist die Körpergewichtsentwicklung in Gramm der einzelnen Versuchsguppen wiedergegeben.

- Symbole: - - - - - Kontrolltiere (ohne jede Behandlung)
- — ● — ● — Tiere, die 10 Millionen  $C_{57}BL/6$ -Milz-  
zellen/g KG erhielten
- — ○ — ○ — Tiere, die 3 x 20 mg Asta 5122/kg KG  
erhielten
- ▲ — ▲ — ▲ — Tiere, die 10 Millionen  $C_{57}BL/6$ -Milz-  
zellen/g KG und dann 3 x 20 mg Asta  
5122/kg KG erhielten.

Kontrolltier starb im Beobachtungszeitraum. Die Tiere, die nur Milzzellen bekommen hatten, zeigten eine normale g-v-h-Reaktion. Sie starben alle innerhalb von 24 Tagen. Ihr Körpergewicht stieg bis zum 10. Tag wie bei Gesunden an, hielt sich dann mehrere Tage auf der gleichen Höhe, um bei weiterer Dauer der g-v-h-Reaktion wieder abzufallen. Auch die Tiere, die nur das Medikament bekommen hatten, zeigten eine verminderte Gewichtsentwicklung gegenüber der Kontrollgruppe. Die Mortalität dieser Versuchsgruppe war nur geringfügig erhöht im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren. Die Tiere, die sowohl Milzzellen wie auch das Pharmakon bekommen hatten, starben alle im Beobachtungszeitraum, wenn auch im Durchschnitt später als die Tiere mit unbehandelter g-v-h-Reaktion. Die Körpergewichte dieser Versuchsgruppe (Zellen und anschließend Asta 5122) nahmen bis zum 12. Tag wie die der gesunden Kontrollgruppe zu, sanken dann aber kontinuierlich ab.

Diskussion: Die hier gezeigte unbeeinflusste g-v-h-Reaktion ist durch die verwendete starke genetische Differenz und die benutzte optimale Zahl transferierter Zellen hervorgerufen. Die geringere Gewichtszunahme der Tiere, die nur Asta 5122 bekommen hatten, muß als Zeichen der Toxizität des Medikamentes in dieser Dosierung gewertet werden.

Bei der Mortalität der Tiere, die Milzzellen und das Pharmakon Asta 5122 bekommen hatten, ist es nun nicht möglich zu differenzieren, ob das Medikament völlig unwirksam war und folglich die Tiere an einer unbeflüßten g-v-h-Reaktion gestorben sind (wie in Gruppe 1) oder ob das Medikament durchaus wirksam war, aber durch die Addition der oben nachgewiesenen Toxizität des Präparates Asta 5122 mit der Letalität der nicht ausreichend gehemmten g-v-h-Reaktion es keine Auswirkung auf die Mortalität der Tiere erbringen konnte.

Im Hinblick auf die im humoralen System nachgewiesene starke Wirksamkeit von Asta 5122 schien diese Meßmethode der g-v-h-Reaktion, Körpergewichtsentwicklung und Mortalität der Tiere, also nicht geeignet, die Wirksamkeit auf die T-Zellreaktivität nachzuweisen. So suchten wir zunächst nach einer genaueren Methode, Einflüsse auf die g-v-h-Reaktion zu quantifizieren.

#### 2.2.2. Versuch 2      Konventionelles graft-versus-host-Modell Organindexmessung

Es soll hier in der gleichen Versuchsanordnung, wie in Versuch 1, durch einen anderen Auswertungsmodus, nämlich die Bestimmung des Organindex, versucht werden, bei der Messung der g-v-h-Reaktivität, auch nach Gabe

eines T-zellhemmenden Pharmakons, zwischen der verbleibenden T-Zellreaktivität und der Toxizität des Medikamentes zu differenzieren.

Analog zum ersten Versuch wurden neugeborene  $C_{57}Bl/6xA-F_1$ -Hybride eines Wurfes in drei Gruppen unterteilt. Dabei bekam Gruppe 1 am 3. Lebenstag  $C_{57}Bl/6$ -Milzzellen/g KG, Gruppe 2 vom 4. - 6. Lebenstag 3 x 20 mg Asta 036.5122/kg KG und Gruppe 3 am 3. Lebenstag Zellen (wie Gruppe 1) und das Pharmakon vom 4. - 6. Lebenstag (wie Gruppe 2). 10 Tage nach Zellinjektion wurden die Tiere gewogen, dann getötet, ausgeblutet und Leber, Milz und Thymus einzeln gewogen. Die Meßwerte wurden in der oben angegebenen Weise in Organindices umgerechnet, deren Mittelwerte mit Streuungen in Abbildung 4a zu sehen sind.

Ergebnis: Es zeigte sich dabei und in der Tabelle der rangierten Summenwerte (Abb. 4b), daß die normale g-v-h-Reaktion die größten Organveränderungen herbeiführte (Hepato-Splenomegalie, Thymusinvolution), daß die Injektion des Immunsuppressivums keine oder nur geringe Abweichungen der Organindices vom Wert 1 zeigte, während bei Applikation von Zellen und Asta 5122 die Organindices sich gegenüber der normalen g-v-h-Reaktion verminderten, wobei diese Verminderung auch in der Tabelle der rangierten Summenwerte nur statistisch auffällig, aber nicht signifikant war.



Diskussion: Durch die geänderte Meßmethode der Organindices in diesem Versuch gegenüber der Letalitäts- und Körpergewichtsmessung im Vorversuch konnte jetzt eine gewisse hemmende Wirksamkeit des Pharmakons Asta 5122 auf die T-Zellreaktivität im konventionellen g-v-h-Modell nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der stark immunsuppressiven Wirkung im humoralen System ist die Wirkung auf die T-Zellreaktivität jedoch gering. Steigerung der Dosis ist für die Jungtiere toxisch, und zwar schon in Bereichen, die von erwachsenen Tieren gut toleriert werden. Wir suchen also nach einem Testmodell, bei dem wir, bei gleichen Quantifizierungsmöglichkeiten der T-Zellreaktivität, einen eindeutigen Hinweis auf die verschiedenen Einflußnahmen der g-v-h-Reaktion bekämen.

### 2.2.3. Versuch 3 Modifikation des konventionellen g-v-h-Modells

Die geringe Wirksamkeit von Asta 5122 in den beiden vorangegangenen Experimenten der Beeinflussung der zellulären Immunität steht im Widerspruch zu der nachgewiesenen guten immunsuppressiven Wirkung im humoralen System (Drug Research 24).

Der Grund könnte zum einen darin liegen, daß Asta 5122 nur oder vorwiegend im humoralen System wirkt, zum anderen darin, daß das hier benutzte konventionelle Modell nicht

geeignet ist, die Wirksamkeit nachzuweisen. Es soll hier überprüft werden, ob durch ein anderes Versuchsmodell eine Wirksamkeit von O36.5122 auch im Bereich der zellulären Immunität nachzuweisen ist.

In der bisher benutzten Versuchsanordnung werden sowohl die für die g-v-h-Reaktion verantwortlichen Milzzellen als auch das Medikament in die neugeborenen F<sub>1</sub>-Hybride injiziert. Aus den sich ergebenden Letalitätsskurven ist nicht sicher zu differenzieren, wie hoch zum einen der Anteil der durch die für Jungtiere offensichtlich höhere Toxizität des Medikamentes, zum anderen der Anteil der durch die zumindest nicht vollständig gehemmte g-v-h-Reaktion verstorbenen Tiere ist.

Um diesen großen Nachteil des Experimentalansatzes zu umgehen, kann man die Modifikation der g-v-h-Reaktion nach Lemmel benutzen. Dabei wird der Zellspender gegenüber den Antigenen des zukünftigen Empfängers immunisiert, anschließend wird die Reaktion im Zellspender, die sich gegen die gleichen Antigene richtet, die auch die konventionelle g-v-h-Reaktion provozieren (A→B), durch Immunsuppressiva unterdrückt. Eine erfolgreiche Suppression der zellulären Immunität kann nach Übertragung immunkompetenter Zellen im geeigneten Empfängertier durch verminderte g-v-h-Reaktivität festgestellt werden (siehe auch Abb. 5).

# Spezifische Modifikation der g.-v.-h. Reaktivität

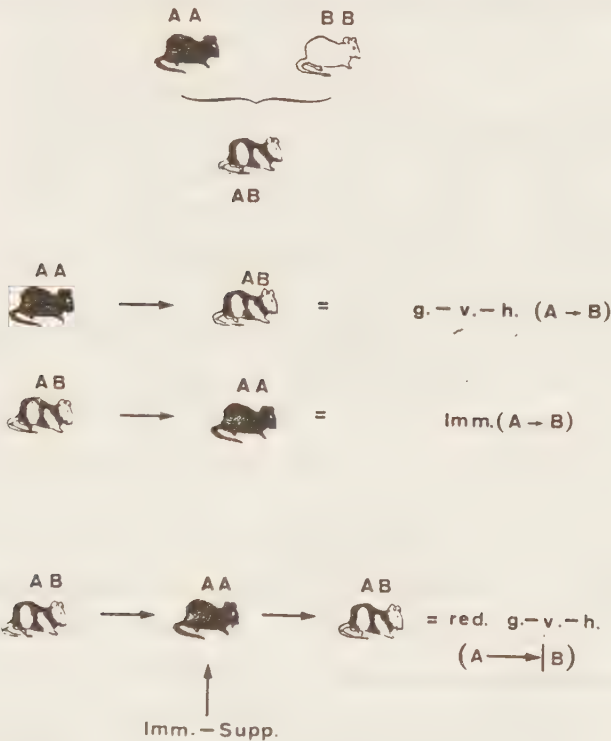


Abb. 5:

Schematische Darstellung eines neuen Testsystems zum Nachweis verminderter zellulärer Immunreaktivität nach immunsuppressiver Therapie. - In dem modifizierten Modell des graft-versus-host-Tests wird der Zellspender gegenüber dem Antigen des zukünftigen Empfängers immunisiert und anschließend einer immunsuppressiven Behandlung unterworfen. Eine erfolgreiche Hemmung der Immunantwort kann in verminderter g-v-h-Reaktivität nach Zellübertragung auf entsprechende Empfänger nachgewiesen werden (siehe Text).

Es wurde folgendermaßen vorgegangen: erwachsene C<sub>57</sub>Bl/6-Mäuse bekamen jeweils zwischen 80 und 150 Millionen C<sub>57</sub>Bl/6xA-Milzzellen intraperitoneal injiziert, 24 Stunden später erhielt ein Teil der Tiere sowie eine weitere Gruppe von C<sub>57</sub>Bl/6-Mäusen 100 mg/kg Körpergewicht Asta 5122. In dieser Versuchsanordnung wird eine Transplantationsreaktion (T-Zellreaktion C<sub>57</sub>Bl/6 gegen die A-Komponente des übertragenen Materials) induziert, die durch die nachfolgende Gabe von Asta 5122 gezielt gehemmt werden soll: die immunisierten und behandelten Tiere müßten bevorzugt in ihrer Reaktivität C<sub>57</sub>Bl/6-A gehemmt sein.

Um nun die angestrebte Hemmung der T-Zellreaktivität im Vergleich zu derjenigen von unbehandelten Tieren erkennen zu können, wurden Milzzellen der auf die verschiedenartige Weise vorbehandelten C<sub>57</sub>Bl/6 Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Vorbehandlung auf drei Tage alte C<sub>57</sub>Bl/6xA-F<sub>1</sub>-Hybride übertragen. Zur Kontrolle wurden gleichzeitig Milzzellen nicht vorimmunisierter C<sub>57</sub>Bl/6-Tiere auf drei Tage alte C<sub>57</sub>Bl/6xA-F<sub>1</sub>-Hybride transferiert. Es wurden jeweils ca. 10 Millionen lebende Zellen pro Gramm KG injiziert. Die Tiere eines Wurfes wurden in fünf Gruppen eingeteilt: Neben unbehandelten Kontrolltieren ergaben sich vier Empfängergruppen, die

Milzzellen folgender unterschiedlicher Spender erhielten:

1. unbehandelte C<sub>57</sub>Bl/6-Mäuse
2. C<sub>57</sub>Bl/6-Mäuse, die mit C<sub>57</sub>Bl/6xA-Zellen vorimmunisiert wurden
3. C<sub>57</sub>Bl/6-Mäuse, die mit Asta 5122 vorbehandelt wurden
4. C<sub>57</sub>Bl/6-Mäuse, die mit C<sub>57</sub>Bl/6xA-Zellen vorimmunisiert und dann mit Asta 5122 vorbehandelt wurden.

10 Tage nach Zelltransfer wurden die Empfänger und die Kontrolltiere getötet und die Organindices und die rangierten Summenwerte in oben beschriebener Weise bestimmt und berechnet.

#### Versuch 3A Zelltransfer 7 Tage nach Vorbehandlung

Ergebnis: In Abb. 6a sind die Organindices mit ihren Streuwerten und in Abb. 6b die rangierten Summenwerte für die Zellübertragung 7 Tage nach der Vorimmunisierung der Spender wiedergegeben. Die nicht vorbehandelten Spenderzellen führen zu den Organveränderungen einer normalen g-v-h-Reaktion. Vorimmunisierte Spenderzellen führen ebenfalls zu Organveränderungen, die in der Größenordnung einer normalen g-v-h-Reaktion liegen. Auch Zellen von Spendern, die nur mit Asta 5122 vorbehandelt waren, er-



gaben Organveränderungen, die weitgehend denen einer normalen g-v-h-Reaktion entsprachen. In der vierten Gruppe, deren Spendermaterial von Tieren stammte, die mit Zellen und Therapie vorbehandelt worden waren, waren die Organveränderungen deutlich gegenüber den drei anderen Gruppen vermindert, den Werten für Kontrolltiere (Index = 1) angenähert. Die Tabelle der rangierten Summenwerte zeigt diese Verminderung der Reaktivität in ihrer statistischen Signifikanz.

Interpretation: Vorimmunisierung mit dem Antigen führt zu keiner Veränderung der g-v-h-Reaktion und damit der T-Zellreaktivität. Ebenso bringt die alleinige Applikation des Pharmakons keine Veränderung der g-v-h-Reaktion. Wird aber erst Antigen und dann das Pharmakon in das Spendertier appliziert, so zeigt sich in der deutlich verminderten g-v-h-Reaktion eine Hemmung der T-Zellreaktivität. Es wird durch das Medikament im Spendertier die Reaktion gegen die A-Komponente der zur Vorimmunisierung verwendeten C<sub>57</sub>Bl/6xA-Tiere gehemmt.

In diesem Versuch, mit dem Abstand von 7 Tagen zwischen Vorimmunisierung und Zelltransfer, ist eine Verminderung der T-Zellreaktivität nachweisbar. Es sollte auch untersucht werden, wie lange die medikamentöse Unterdrückung

der Reaktivität im Spendertier anhält. Die Zeitintervalle zwischen der Vorbehandlung des Spenders und dem Zelltransfer betrugen außer dem 7-Tage-Abstand 10, 14, 17, 20 und 30 Tage.

#### Versuch 3B Zelltransfer 10 Tage nach Vorbehandlung

Ergebnis: In Abb. 7a sind die Organindices mit ihren Streuwerten, in Abb. 7b die rangierten Summenwerte für den Abstand von 10 Tagen zwischen Vorimmunisierung und Zelltransfer wiedergegeben. Auch hier führen die nicht vorbehandelten Spenderzellen zu den Organveränderungen einer normalen g-v-h-Reaktion. Sowohl die Milzzellen vorimmunisierter Spenderzellen wie auch die mit Asta 5122 vorbehandelten Spender führten zu Organveränderungen, die in der Größenordnung einer normalen g-v-h-Reaktion lagen. In der vierten Gruppe, deren Spendermaterial von Tieren stammte, die mit Zellen und Therapie vorbehandelt worden waren, zeigten sich gegenüber den anderen drei Gruppen signifikant verminderte Organveränderungen.

Die Abbildungen 6a und 6b wie auch 7a und 7b zeigen, daß zwischen den Organveränderungen bei unbeeinflusster g-v-h-Reaktion, bei g-v-h-Reaktion mit Spendervorimmunisierung von Zellen und bei g-v-h-Reaktion mit Vorbehandlung mit dem Medikament keine Unterschiede feststellbar sind



und die Größe der Organveränderungen wie bei unbeeinflusster g-v-h-Reaktion ist. Daher werden im folgenden Versuch die zweite Gruppe (Vorbehandlung mit Zellen) und die dritte Gruppe (Vorbehandlung mit Therapie) nicht mit aufgeführt, es werden also nur die erste Gruppe mit unbehandelten Spendertieren und die 4. Gruppe mit Spendern, die vorimmunisiert wurden und anschließend mit dem Pharmakon behandelt wurden, hinsichtlich ihrer g-v-h-Reaktivität gegenübergestellt.

#### Versuch 3C Zelltransfer 14 Tage nach Vorbehandlung

Ergebnis: Abb. 8a zeigt die Organindices mit ihren Streuwerten und Abb. 8b die rangierten Summenwerte für den Abstand von 14 Tagen zwischen Vorimmunisierung der Spender und Zelltransfer. Es zeigt sich eine signifikante Verminderung der Reaktivität von vorbehandeltem Spendermaterial gegenüber Zellen von unbeeinflussten Spendern. Die Organveränderungen sind bei allen drei Organen deutlich vermindert.

#### Versuch 3D Zelltransfer 17 Tage nach Vorbehandlung

Ergebnis: In Abb. 9a sind die Organindices mit ihren Streuwerten und in Abb. 9b die rangierten Summenwerte für den Abstand von 17 Tagen zwischen Vorimmunisierung

Abb. 8a und 8b

Versuch 3C      Modifiziertes graft-versus-host-Modell

Zelltransfer 14 Tage nach Vorbehandlung

♂ Tiere, die 10 Millionen C<sub>57</sub>Bl/6-Milzzellen erhielten

♀  
+ Tiere, deren C<sub>57</sub>Bl/6-Spender mit C<sub>57</sub>Bl/6xA-Milzzellen  
und Asta 5122 vorbehandelt wurden

INDEX

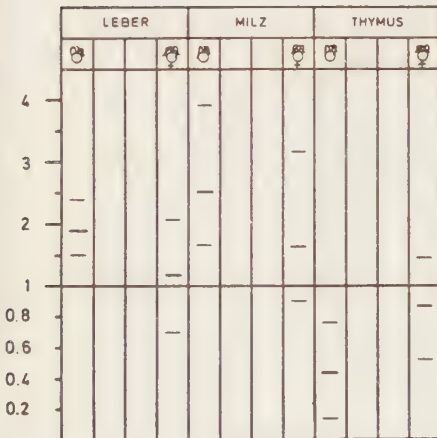


Abb. 8a:

Darstellung der Mittelwerte der Organindices mit ihren tatsächlichen Streuwerten für Leber, Milz und Thymus der jeweiligen Versuchsgruppen

RANG

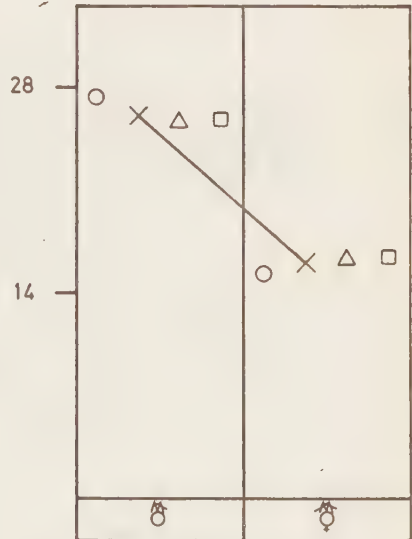


Abb. 8b:

Es sind die rangierten Summenwerte der jeweiligen Versuchsgruppen wiedergegeben:

- X rangierte Summenwerte von Leber, Milz und Thymus zusammen
- Rangzahlen Einzelwert Leber
- △ Rangzahlen Einzelwert Milz
- Rangzahlen Einzelwert Thymus

Abb. 9a und 9b

Versuch 22 Modifiziertes graft-versus-host-Modell

Felltransfer 17 Tage nach Vorbehandlung

♂ Tiere die 10 Millionen C<sub>57</sub>Bl/6-Milzzellen erhielten

♀ Tiere deren C<sub>57</sub>Bl/6-Spender mit C<sub>57</sub>Bl/6xa-Milzzellen und Asta 5122 vorbehandelt wurden

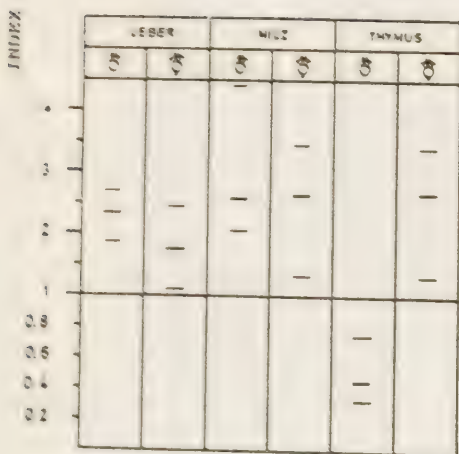


Abb. 9a:

Darstellung der Mittelwerte der Organindices mit ihren tatsächlichen Streuwerten für Leber, Milz und Thymus der jeweiligen Versuchsgruppen.

RANG

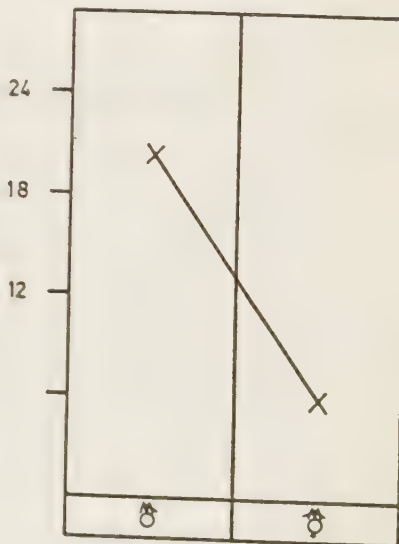


Abb. 9b:

Es sind die rangierten Summenwerte der jeweiligen Versuchsgruppen wiedergegeben.

der Spender und Zelltransfer aufgezeichnet. Die Gruppe der unbehandelten Spendertiere zeigt eine normale g-v-h-Reaktion, der gegenüber die mit Zellen vorimmunisierten und mit Asta 5122 vorbehandelten Spender eine signifikante Verminderung der g-v-h-Reaktivität an allen drei gemessenen Organen aufweisen.

#### Versuch 3E Zelltransfer 20 Tage nach Vorbehandlung

Ergebnis: In Abb. 10a sind die Organindices mit ihren Streuwerten und in Abb. 10b die rangierten Summenwerte für den Abstand von 19/20 Tagen zwischen Vorimmunisierung der Spender und Zelltransfer wiedergegeben. Die Gruppe der unbehandelten Spendertiere zeigt normale g-v-h-Reaktion, der gegenüber die Gruppe der mit Zellen vorimmunisierten und mit Asta 5122 vorbehandelten Spender nur noch eine minimale Verminderung der g-v-h-Reaktivität aufweist. Insbesondere die Organindices von Leber und Milz haben sich denen der unbehandelten Gruppe angeglichen.

#### Versuch 3F Zelltransfer 30 Tage nach Vorbehandlung

Ergebnis: Abb. 11a gibt die Organindices und ihre Streuwerte, Abb. 11b die rangierten Summenwerte aller vier Vorbehandlungsgruppen der Spender für den Abstand von

Abb. 10a und 10b

Versuch 3E      Modifiziertes graft-versus-host-Modell

Zelltransfer 20 Tage nach Vorbehandlung

- ♂ Tiere, die 10 Millionen  $C_{57}Bl/6$ -Milzzellen erhielten (normale g-v-h-Reaktion)
- ♂ Tiere, deren  $C_{57}Bl/6$ -Spender mit  $C_{57}Bl/6xA$ -Milzzellen vorimmunisiert wurden
- ♂ Tiere, deren  $C_{57}Bl/6$ -Spender mit 100 mg Asta 5122/kg KG vorbehandelt wurden
- ♀ Tiere, deren  $C_{57}Bl/6$ -Spender mit  $C_{57}Bl/6xA$ -Milzzellen und Asta 5122 vorbehandelt wurden

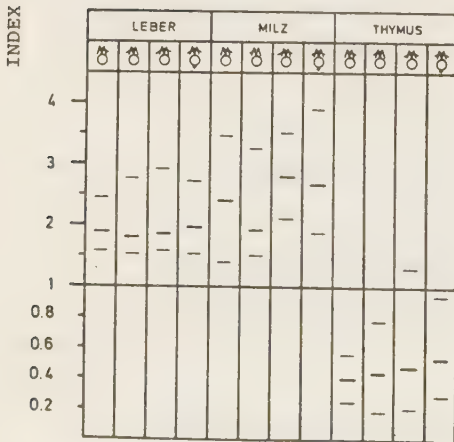


Abb. 10a:

Darstellung der Mittelwerte der Organindices mit ihren tatsächlichen Streuwerten für Leber, Milz und Thymus der jeweiligen Versuchsgruppen

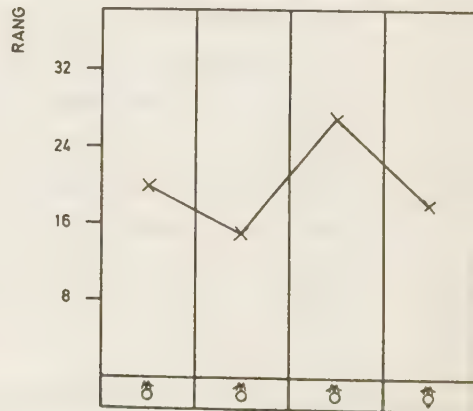


Abb. 10b:

Es sind die rangierten Summenwerte der jeweiligen Versuchsgruppen wie-dergegeben:

X rangierte Summenwerte von Leber, Milz und Thymus zusammen

Abb. 11a und 11b

Versuch 3F      Modifiziertes graft-versus-host-Modell

Zelltransfer 30 Tage nach Vorbehandlung

♂ Tiere, die 10 Millionen C<sub>57</sub>Bl/6-Milzzellen erhielten

♀ Tiere, deren C<sub>57</sub>Bl/6-Spender mit C<sub>57</sub>Bl/6xA-Milzzellen und Asta 5122 vorbehandelt wurden

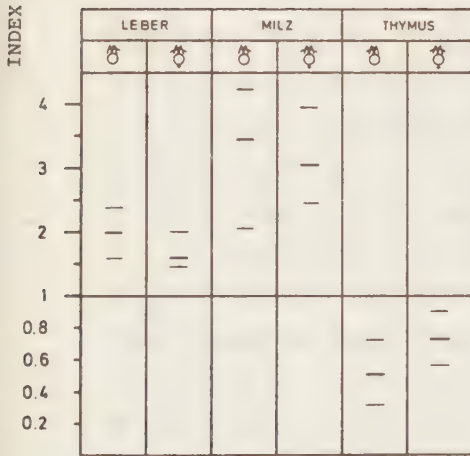


Abb. 11a:

Darstellung der Mittelwerte der Organindices mit ihren tatsächlichen Streuwerten für Leber, Milz und Thymus der jeweiligen Versuchsgruppen

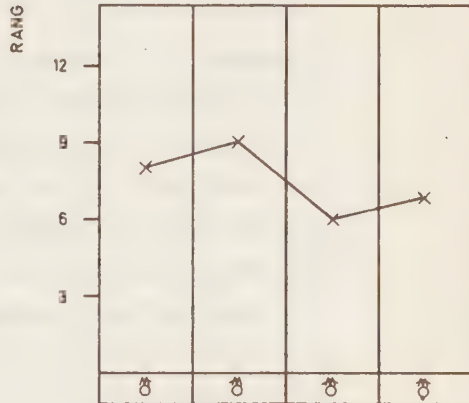


Abb. 11b:

Es sind die rangierten Summenwerte der jeweiligen Versuchsgruppen wiedergegeben:

X rangierte Summenwerte von Leber, Milz und Thymus zusammen

30 Tagen zwischen Vorimmunisierung der Spender und Zelltransfer wieder. Es zeigen sich in allen vier Gruppen gleich große Organveränderungen, die in der Größenordnung der unbeeinflussten g-v-h-Reaktion liegen. Beträgt der Abstand 30 Tage zwischen der Vorimmunisierung mit Zellen oder der Vorbehandlung mit Asta 5122 oder beiden Vorbehandlungsarten und dem Zelltransfer, so ist keinerlei unterschiedliche T-Zellreaktivität durch unterschiedliche Spendervorimmunisierung bzw. medikamentöse Spendervorbehandlung mehr zu sehen.

Diskussion: Im Unterschied zu dem konventionellen g-v-h-Modell kann in der hier vorgelegten Modifikation eine Hemmwirkung des Medikamentes Asta 036.5122 auf T-Zellfunktionen deutlich nachgewiesen werden. Diese T-Zellhemmung erfolgt im Spendertier nach Immunisierung mit Zellmaterial des potentiellen Empfängers und anschließender immunsuppressiver Behandlung. Das Ausmaß der induzierten T-Zellhemmung kann nach Übertragung auf einen geeigneten Empfänger durch Bestimmung der g-v-h-Reaktivität gemessen werden, und zwar im Vergleich mit der Reaktivität von Zellen normaler oder anderweitig vorbehandelter Spender. Auf diese Weise kann gezeigt werden, daß auch durch eine alleinige Vorimmunisierung des Spenders dessen g-v-h-Reaktivität in der hier gewählten genetischen Kombination nicht beeinflußt ist. Es wäre als Folge der Immunisierung

gegebenenfalls eine Steigerung zu erwarten, diese ist jedoch bei H2-differenten Stammkombinationen nicht zu erzielen, da in diesem Fall bereits die normale g-v-h-Reaktion zu maximalen Organveränderungen führt.

Weiterhin kann gezeigt werden, daß durch alleinige Vorbehandlung des Spenders mit Asta 5122 dessen g-v-h-Reaktivität nicht beeinflußt wird. Es konnte zwar früher (Arzneimittel Forsch. 24 Nr. 8 1167-1172 [1974]) nachgewiesen werden, daß diese Substanz eine ausgeprägte Leukopenie induziert. Da für den Transfer stets standardisierte Zellzahlen verwendet werden, wird die therapiebedingte Leukozytenverarmung aber ausgeglichen, ein funktioneller Defekt ist nicht nachweisbar.

Wird der Spender jedoch vorimmunisiert (eine T-Zellaktivierung gegen Empfängerantigene also eingeleitet) und wird der Spender anschließend "immunsuppressiv" behandelt, so resultiert aus diesem Synergismus von Antigen und Pharmakon eine deutliche Hemmung der T-Zellreaktivität, die mit Hilfe der Parameter der g-v-h-Reaktion quantifiziert werden kann.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen (Dosis von Antigen bzw. Pharmakon) ist diese verminderte Reaktivität über

zumindest 17 Tage nach Vorbehandlung des Spenders zu beobachten. Wird der Transfer zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt, so hat sich die Reaktivität des vorbehandelten Spendertieres wieder derjenigen der Kontrollspender angeglichen.

Da normalerweise die pharmakologisch induzierte Immunsuppression hinsichtlich Ausmaß und Dauer unter anderem abhängig ist von der zur Immunisierung verwendeten Antigendosis und der zur Behandlung verwendeten Pharmakondosis, soll im folgenden untersucht werden, ob auch das Ausmaß der induzierten T-Zellhemmung durch Veränderung der Antigendosis beeinflusst werden kann.

#### 2.2.4. Versuch 4    Modifiziertes g-v-h-Modell

##### T-Zellhemmung in Abhängigkeit von Antigendosis

Zur Untersuchung des Einflusses der Antigendosis auf die T-Zellhemmung durch Pharmaka wurde in analoger Weise das unter 2.2.3. vorgestellte modifizierte g-v-h-Modell verwendet. Verglichen wurde die g-v-h-Reaktivität von zwei Spendergruppen, von denen die eine mit je 80 Millionen Milzzellen (Spendergruppe A), die andere mit je 150 Millionen Milzzellen (Spendergruppe B) vorimmunisiert wurde. Die Dosis von Asta 5122 blieb gleich (je 100 mg/kg), sie wurde stets 24 Stunden nach der Immunisierung gegeben.

Der Zelltransfer auf C<sub>57</sub>Bl/6xA-F<sub>1</sub>-Hybride zur Testung der g-v-h-Reaktivität erfolgte 7, 10 und 14 Tage nach Vorbehandlung der Spender, als Kontrolle diente jeweils die g-v-h-Reaktivität eines unbehandelten normalen Spendertieres.

Zur Bestimmung und Gegenüberstellung der g-v-h-Reaktivität von Spendergruppe A und Spendergruppe B wurden zwei Empfängergruppen gebildet: Empfängergruppe A und Empfängergruppe B. In beiden Gruppen wurden die Empfängertierwürfe in folgender Weise unterteilt: a) unbehandeltes Kontrolltier b) Empfänger unbehandelter Kontrollzellen (normale g-v-h-Reaktion) c) Empfänger des vorbehandelten Spendermaterials A bzw. B (Nachweis der T-Zellhemmung). In jeder Empfängergruppe wurden 10 Tage nach Zelltransfer die Organindices für b und c bestimmt und wie in 2.1.5.3. angeführt in Summenwerte folgender Testgruppen umgeformt:

Ab (g-v-h-Reaktivität eines normalen Spenders)

Ac (g-v-h-Reaktivität des Spendermaterials A  
Vorimmunisierung mit 80 Millionen Zellen  
und Asta 5122)

Bb (g-v-h-Reaktivität eines normalen Spenders)

Bc (g-v-h-Reaktivität der Spendergruppe B  
Vorimmunisierung mit 150 Millionen Zellen  
und Asta 5122).

Innerhalb jedes Einzelwurfes werden dann die Summenwerte  $A_c$  (bzw.  $B_c$ ) von den Summenwerten  $A_b$  (bzw.  $B_b$ ) abgezogen. Diese "Differenzwerte" im Versuchsblock A wie auch im Versuchsblock B quantifizieren die Veränderung der g-v-h-Reaktivität, die sich durch die unterschiedliche Vorbehandlung zwischen A und B ergeben. Zur statistischen Auswertung mit dem Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben wurden diese Differenzwerte über beide Versuchsblöcke mit Rangzahlen versehen, mit Rang 1 für die kleinste Differenz beginnend.

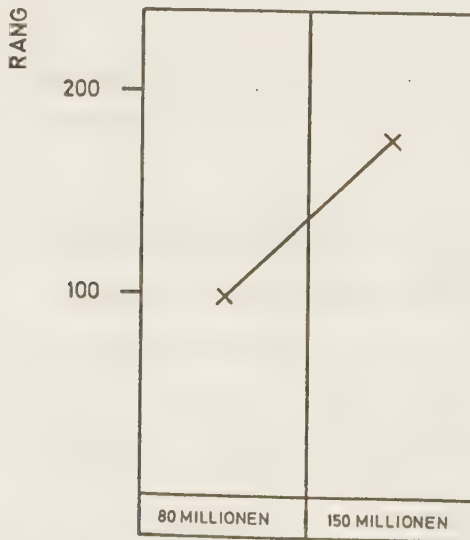


Abb. 12:

Versuch 4    Modifiziertes graft-versus-host-Modell  
T-Zellhemmung in Abhängigkeit von Antigendosis.

Es sind die nach oben angegebener Weise errechneten Rangzahlen für die Versuchsgruppe A (80 Millionen Milzzellen zur Vorimmunisierung) und die Versuchsgruppe B (150 Millionen zur Vorimmunisierung) graphisch gegenübergestellt.

Ergebnis: In Tabelle 12 ist das Ergebnis anhand des oben angegebenen Berechnungsverfahrens dargestellt. Wenn man diese Ergebnisse auf ihre Signifikanz prüft, ergibt sich, daß die Differenzwerte für die Versuchsgruppe B signifikant größer sind als die der Versuchsgruppe A. Das heißt, daß die Steigerung der zur Vorimmunisierung der Spendertiere verwendeten Zellzahl von 80 (Versuchsgruppe A) auf 150 Millionen (Versuchsgruppe B) bei gleichbleibender immunsuppressiver Behandlung (Asta 5122 100 mg/kg KG) zu einer signifikant stärkeren Hemmung der g-v-h-Reaktivität führt.

Dieser Versuch mit Hilfe des modifizierten g-v-h-Modells beweist also, daß das Ausmaß der pharmakologisch vermittelten Suppression der T-Zellreaktivität von der zur Immunisierung verwendeten Antigendosis abhängig ist.

#### 2.2.5. Versuch 5 Modifiziertes g-v-h-Modell

##### Medikament zum Vergleich: Azathioprin

Im nächsten Experimentalansatz sollte überprüft werden, ob auch ein anderes als "immunsuppressiv" bekanntes Pharmakon in dem modifizierten g-v-h-Modell zu einer Beeinflussung der T-Zellreaktivität führt. Es wurde das zu den Antimetaboliten gehörende Azathioprin (Imurek<sup>®</sup>) gewählt, das in Parallelversuchen in Hinblick auf seine Hemmwirkung auf humorale Immunreaktionen bei der Maus mit denen der Alkylantien

verglichen worden war (Lemmel, Botzenhardt Drug Res. 26 [1976] ). Es lag als Reinsubstanz in pulverisierter Form vor und wurde in der unter 2.1.3. beschriebenen Weise als Injektionslösung vorbereitet. Es wurde 3 x 80 mg/kg Körpergewicht der Maus Imurek<sup>®</sup> im 24-Stunden-Abstand injiziert, beginnend 24 Stunden nach der Vorimmunisierung. Zur Vorimmunisierung wurde den erwachsenen C<sub>57</sub>Bl/6-Tieren 100 Millionen C<sub>57</sub>Bl/6xA-Zellen injiziert. 14 Tage später wurden die jeweils 10 Millionen Spenderzellen pro g Körpergewicht auf junge C<sub>57</sub>Bl/6xA-Tiere übertragen. Es entstanden dadurch, je nach Vorbehandlung der Spender, folgende Empfängergruppen:

1. Tiere, die unbehandelte C<sub>57</sub>Bl/6-Zellen bekamen,
2. Tiere, die C<sub>57</sub>Bl/6-Zellen von Tieren bekamen, die mit C<sub>57</sub>Bl/6xA vorimmunisiert waren,
3. Tiere, die C<sub>57</sub>Bl/6-Zellen von Tieren bekamen, die mit 3 x 80 mg/kg Azathioprin vorbehandelt waren,
4. Tiere, die C<sub>57</sub>Bl/6-Zellen von Tieren bekamen, die mit C<sub>57</sub>Bl/6xA-Zellen vorimmunisiert und mit Azathioprin vorbehandelt waren.

10 Tage nach Zelltransfer wurden die Empfänger- und Kontrolltiere getötet und die Organindices in oben beschriebener Weise bestimmt.

Abb. 13a und 13b

Versuch 5 Modifiziertes graft-versus-host-Modell

Medikament zum Vergleich: Azathioprin

- ♂ Tiere, die unbehandelte  $C_{57}Bl/6$ -Zellen bekamen
- ♂ Tiere, die  $C_{57}Bl/6$ -Milzzellen von Tieren bekamen, die mit  $C_{57}Bl/6xA$ -Zellen vorimmunisiert waren
- ♂ Tiere, die  $C_{57}Bl/6$ -Milzzellen von Tieren bekamen, die mit  $3 \times 80$  mg/kg Azathioprin vorbehandelt waren
- ♀ Tiere, die  $C_{57}Bl/6$ -Zellen von Tieren bekamen, die sowohl mit  $C_{57}Bl/6xA$ -Zellen vorimmunisiert als auch mit Azathioprin vorbehandelt waren

INDEX

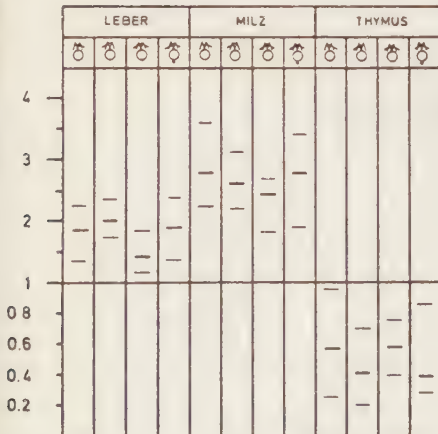


Abb. 13a:

Es sind die Mittelwerte der Organ-indices mit ihren tatsächlichen Streuwerten für Leber, Milz und Thymus der jeweiligen Versuchsgruppen dargestellt.

RANG

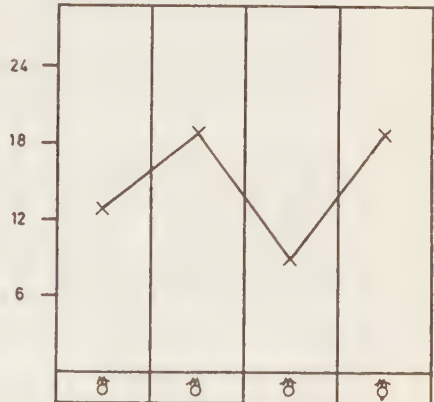


Abb. 13b:

Es sind die rangierten Summenwerte aller drei Organe für die jeweiligen Versuchsgruppen wiedergegeben.

Ergebnis: In Abb. 13a sind die Organindices mit ihren Streuwerten für diesen Versuch wiedergegeben. Die Organindices der Tiere, die zum einen unvorbehandelte Milzzellen, zum anderen mit C<sub>57</sub>Bl/6xA vorimmunisierte Zellen bekommen hatten, wiesen gleichermaßen in ihrer Größenordnung auf eine normale g-v-h-Reaktion (wie bereits in den vorher wiedergegebenen Versuchen des modifizierten g-v-h-Modells) hin. Bei der Gruppe, deren Spender mit 3 x 80 mg/kg Azathioprin vorbehandelt worden war, zeigte sich der Leberindex vermindert, Milz- und Thymusindex gleich groß im Vergleich zur normalen g-v-h-Reaktion. Jene Tiere, deren Spender sowohl mit Zellen als auch mit Azathioprin vorbehandelt worden waren, zeigten gegenüber der normalen g-v-h-Reaktion keine Verminderung der Organindices.

Die in Abb. 13a wiedergegebenen Resultate wurden entsprechend der unter 2.1.2.5. wiedergegebenen Methode zu rangierten Summenwerten umgeformt und die Unterschiedlichkeit der Experimentalgruppen auf ihre statistische Signifikanz geprüft. Die Ergebnisse sind in Abb. 13b wiedergegeben. Zwar ergeben sich gewisse Unterschiedlichkeiten zwischen den Experimentalgruppen, die jedoch alle im Vergleich mit der normalen g-v-h-Reaktion keine auffälligen Abweichungen aufweisen.

Auch in diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß eine vor-

behandlung der Spender weder mit Antigen allein noch mit Imurek allein zu einer Beeinträchtigung von deren T-Zellreaktivität führte. Im Gegensatz zu den vorgelegten, entsprechenden Untersuchungen mit Asta 5122 führt jedoch auch die Kombination von Antigen und Pharmakon nicht zu einer Hemmung der g-v-h-Reaktivität der Spendertiere. Damit kann für Imurek in diesem Experimentalansatz im Vergleich zu Asta 5122 keine Hemmung der T-Zellreaktivität bei der Maus nachgewiesen werden.

#### 2.2.6. Versuch 6    Modifiziertes g-v-h-Modell

##### Vorimmunisierung mit Schafer erythrozyten (SRBC)

Es ist bereits gelungen, durch alkylierende Substanzen immunologische Toleranz gegen Schafer erythrozyten (SRBC) in Mäusen zu induzieren. Hier soll jetzt untersucht werden, ob Milzzellen von Spendern, die gegen SRBC tolerant gemacht wurden, sich in ihrer T-Zellreaktivität im modifizierten g-v-h-Modell von der Reaktivität unterscheiden, die Milzzellen unbehandelter Spender hervorrufen.

Zur Induktion von Toleranz gegenüber Schafer erythrozyten wurden erwachsene  $C_{57}Bl6/-$ -Tiere mit  $5 \times 10^9$  Schafer erythrozyten vorimmunisiert. 24 Stunden später und dann fünfmal im 24-Stunden-Abstand erhielt ein Teil der Mäuse 20 mg/kg Körpergewicht Asta 5122 injiziert. Daß diese Vorbehandlung tatsächlich zur

Toleranzinduktion führt, konnte in der Untersuchung von Botzenhardt und Lemmel (Fol. Biol. 21, [1975] ) gezeigt werden.

Zehn Tage nach Vorbehandlung wurden Milzzellen dieser Tiere auf junge  $C_{57}Bl/6xA$ -Mäuse übertragen. Dabei entstanden folgende Untersuchungsgruppen:

1. Tiere, die unbehandelte  $C_{57}Bl/6$ -Zellen bekamen,
2. Tiere, die  $C_{57}Bl/6$ -Zellen von Tieren bekamen, die mit  $5 \times 10^9$  Schaferythrozyten vorimmunisiert waren,
3. Tiere, die  $C_{57}Bl/6$ -Zellen von Spendern bekamen, die mit SRBC und Asta 5122 vorimmunisiert und vorbehandelt waren.

10 Tage nach Zelltransfer wurden Empfänger- und Kontrolltiere getötet und die Organindices in der oben beschriebenen Weise bestimmt.

Ergebnis: In Abb. 14a sind die Organindices mit ihren Streuwerten für diesen Versuch wiedergegeben. Die Tiere der Gruppe, die unbehandelte  $C_{57}Bl/6$ -Zellen bekommen hatten, wiesen eine normal starke g-v-h-Reaktion auf. Die Milzzellen von Spendern, die mit SRBC vorimmunisiert worden waren, führten zu einer gleich starken g-v-h-Reaktivität und damit auch etwa gleich großen Organveränderungen an Leber, Milz und Thymus

Abb. 14a und 14b

Versuch 6 Modifiziertes graft-versus-host-Modell

Vorimmunisierung mit Schaferythrozyten (SRBC)

- ♂ Tiere, die unbehandelte C<sub>57</sub>Bl/6-Zellen bekamen
- ♂ Tiere, die C<sub>57</sub>Bl/6-Zellen von Tieren bekamen, die mit  $5 \times 10^9$  Schaferythrozyten vorimmunisiert waren
- ♀<sup>+</sup> Tiere, die C<sub>57</sub>Bl/6-Zellen von Tieren bekamen, die mit SRBC und Asta 5122 vorimmunisiert und vorbehandelt waren

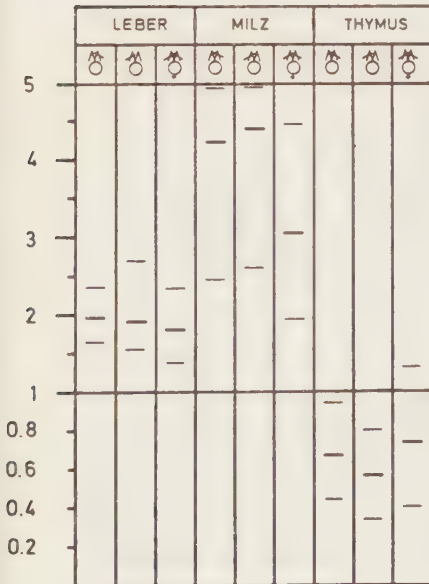


Abb. 14a:

Es sind die Mittelwerte der Organ-indices mit ihren tatsächlichen Streuwerten für Leber, Milz und Thymus der jeweiligen Versuchsgruppen dargestellt.

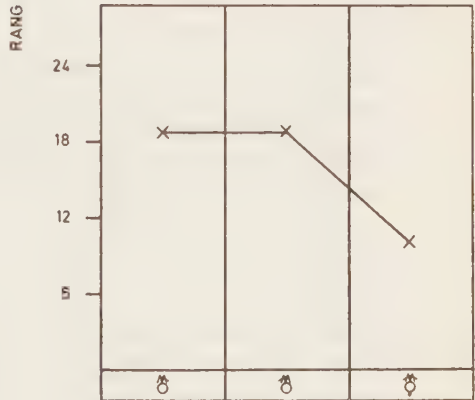


Abb. 14b:

Es sind die rangierten Summenwerte aller drei Organe für die jeweiligen Versuchsgruppen wiedergegeben.

wie die Zellen unbeeinflusster Spender. Wurden Milzzellen von Tieren übertragen, die gegenüber Schafer erythrozyten tolerant waren, so ergaben sich auch hier Organindices für Leber und Thymus, die sich von denen der normalen g-v-h-Reaktion nicht wesentlich unterschieden. Lediglich die von diesem Spendermaterial stammenden Milzindices schienen unterhalb derjenigen der normalen g-v-h-Reaktion zu liegen.

Die Organindices wurden in der unter 2.1.5.3. beschriebenen Weise in Summenwerte umgerechnet und mit Rangzahlen versehen, Abb. 14b gibt die Werte dafür wieder. Es ergab sich eine gleich große Rangsumme für die Spender unvorbehandelter C<sub>57</sub>Bl/6-Zellen wie für die mit SRBC vorimmunisierten Spender. Hingegen unterscheidet sich die Rangsumme der Empfänger von Spendern, die gegen SRBC tolerant waren, in signifikanter Weise von der Gruppe mit normaler g-v-h-Reaktion.

Diskussion: Die mit Hilfe des Rangtestes erfolgte statistische Gegenüberstellung der einzelnen Versuchsgruppen scheint darauf hinzuweisen, daß nach Toleranzinduktion gegen SRBC auch die g-v-h-Reaktivität der toleranten Tiere beeinträchtigt ist. Dieser Befund wäre schwer zu erklären, da zwischen den Antigenen von Schafer erythrozyten und der A-Komponente der Empfänger-tiere (C<sub>57</sub>Bl/6xA) keine Gemeinsamkeit bekannt ist, mit der eine Reaktionsminderung der T-Zellreaktivität gemeinsam gegen SRBC wie gegen H2-Determinanten erklärt werden könnte. Eine

andere Möglichkeit zur Erklärung dieses Befundes besteht in der theoretischen Annahme, daß bei der Toleranzinduktion gegenüber SRBC T-Zellreaktivitäten in unspezifischer Weise beeinträchtigt werden. Auch zur Stützung dieser Annahme gibt es keine Hinweise.

Daß es sich bei im Rangtest gefundenen Unterschiedlichkeiten tatsächlich eher um eine rechnerische als um eine biologische Auffälligkeit handelt, ergibt sich aus der Gegenüberstellung der in Abb. 14a wiedergegebenen Einzelwerte der Organindices.

Die g-v-h-Reaktivität durch Milzzellen von Tieren, die gegenüber SRBC tolerant waren, führte zu Organveränderungen von Leber und Thymus, die in der Größenordnung der normalen g-v-h-Reaktion lagen. Lediglich der erhaltene mittlere Milzindex liegt unterhalb des Mittelwertes der Kontrollgruppen und ist somit allein verantwortlich für die im Rangtest (14b) ermittelte Auffälligkeit. Somit liegen zwei der drei für die g-v-h-Reaktivität bestimmten Werte im Bereich der normalen g-v-h-Reaktion. Die Ursache der Unterschiedlichkeit der erhaltenen Milzindices kann nicht erklärt werden, es ist jedoch darauf hinzuweisen, daß der Milzindex der normalen g-v-h-Reaktion hier auffällig hoch liegt (zum Vergleich Abb. 6a, 7a). Aus den wiedergegebenen Daten kann entnommen werden, daß die Induktion von Toleranz gegen SRBC im Spender dessen g-v-h-Reaktivität nicht beeinflusst.

#### 2.2.7. Versuch 7    Modifiziertes g-v-h-Modell

##### Antigenspezifität der T-Zellhemmung bei genetischer Differenz des Empfängertieres

In den bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Hemmung der T-Zellreaktivität quantifiziert und in ihrer zeitlichen Dauer wie auch in ihrer Abhängigkeit von der Antigendosis bestimmt werden konnte. Im folgenden Experimentalansatz sollte weiter geklärt werden, inwieweit die im Spender erzielte T-Zellhemmung antispezifisch ist. Dafür wurden wie bisher  $C_{57}Bl/6$ -Tiere mit  $C_{57}Bl/6xA$ -Zellen immunisiert und anschließend in standardisierter Weise mit Asta 5122 behandelt. Die Milzzellen dieser Spender wurden nun nicht wie bisher auf  $C_{57}Bl/6xA$ -, sondern auf  $C_{57}Bl/6xC_3H-F_1$ -Hybride übertragen. Es wurde dabei von der Annahme ausgegangen, daß bei einer gegen die A-Komponente gehemmten T-Zellreaktion die g-v-h-Reaktivität gegenüber der  $C_3H$ -Komponente unbeeinflusst bleiben soll.

An der sonstigen Versuchsanordnung, Vorimmunisierung mit 100 Millionen  $C_{57}Bl/6xA$ - bzw. A-Milzzellen und/oder 24 Stunden später 100 mg/kg Asta 5122, änderte sich nichts. Die Übertragung der Milzzellen der Spendertiere erfolgte 7 und 14 Tage nach der Vorbehandlung. Es stehen sich also folgende  $C_{57}Bl/6xC_3H$ -Empfängergruppen gegenüber:

1. mit Zellen von unvorbehandelten C<sub>57</sub>B1/6-Tieren,
2. mit Zellen von Spendern, die C<sub>57</sub>B1/6xA- oder A-Milzzellen zur Vorimmunisierung bekommen hatten,
3. mit Zellen von Spendern, die mit Asta 5122 vorbehandelt waren,
4. mit Zellen von Spendern, die sowohl mit C<sub>57</sub>B1/6xA- oder A-Milzzellen und Asta 5122 vorbehandelt waren.

10 Tage nach Zelltransfer wurden Empfänger- und Kontrolltiere getötet und die Organindices in oben beschriebener Weise bestimmt.

Ergebnis: Abb. 15a gibt die Mittelwerte der Organindices für den Abstand von 7 Tagen zwischen der Vorbehandlung und dem Zelltransfer wieder. Durch die unvorbehandelten Spenderzellen wird eine normale g-v-h-Reaktion hervorgerufen. Die g-v-h-Reaktivität der beiden Spendergruppen, die entweder mit A-Milzzellen vorimmunisiert oder mit Asta 5122 vorbehandelt wurden, hat die annähernd gleiche Größenordnung wie die der normalen g-v-h-Reaktion. Lediglich die Gruppe, deren Spender mit A-Zellen vorimmunisiert und mit Asta 5122 vorbehandelt worden war, zeigte eine eindeutige Verminderung der Organindices, besonders für Leber und Milz. Es wird in der Tabelle der rangierten Summenwerte (Abb. 15b), die auf die unter 2.1.5.3. beschriebene Weise erstellt wurde, be-



sonders deutlich, daß es sich hierbei um eine statistisch auffällige, wenn auch nicht signifikante Reduktion der Organveränderungen gegenüber der normalen g-v-h-Reaktion handelt.

Die gleiche Auffälligkeit verminderter Organindices ergibt sich, wenn zwischen Vorbehandlung der Spendertiere und der Übertragung ein Zeitraum von 14 Tagen lag (Abb. 16). In diesem Fall wurde nur die g-v-h-Reaktivität normaler Spender mit derjenigen solcher Spender verglichen, die mit A-Milzzellen und Asta 5122 vorbehandelt worden waren.

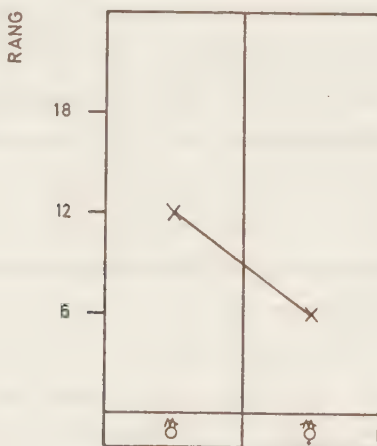


Abb. 16.:

Versuch 7 Modifiziertes graft-versus-host-Modell

Antigenspezifität der T-Zellhemmung bei genetischer Differenz des Empfängertieres

Darstellung der rangierten Summenwerte der drei Organe für die jeweiligen Versuchsgruppen für den Abstand von 14 Tagen zwischen Vorimmunisierung und Zelltransfer



Tiere, die unvorbehandelte  $C_{57}Bl/6$ -Zellen erhielten



Tiere, deren Spender sowohl mit  $C_{57}Bl/6xA$ -Zellen oder A-Milzzellen als auch mit Asta 5122 vorbehandelt worden waren

Diskussion: Die im Ergebnisteil wiedergegebene statistisch auffällige Reduktion der Organveränderungen der  $C_{57}Bl/6 \times C_3H$ -Empfängertiere, deren Spendermaterial ursprünglich gegen die A-Determinante gehemmt wurde, war, entsprechend der oben dargestellten Annahme, nicht erwartet worden.

Erklärbar wäre der Befund zum einen dadurch, daß die in den Vorversuchen durch Immunisierung der Spender mit der A-Komponente induzierte Hemmung der g-v-h-Reaktivität nicht spezifisch gegen diese A-Komponente der benutzten Empfängertiere gerichtet wäre. In diesem Fall wäre die durch das Medikament Asta 5122 hervorgerufene Hemmung der g-v-h-Reaktivität nicht antigenspezifisch und würde sich auch gegen andere Determinanten nachweisen lassen.

Die Annahme einer antigenspezifischen Hemmung kann jedoch bestehen bleiben, wenn man eine genauere Analyse der genetischen Unterschiede zwischen den Tierstämmen A und  $C_3H$  vornimmt. Diese genetische Differenz gilt als "stark", wobei sich dieser Begriff definitionsgemäß auf die Differenz des  $H_2$ -Komplexes beider Inzuchtstämmen bezieht. Es finden sich jedoch identische Loci und Subloci im genetischen Code der Stämme A und  $C_3H$ . Wird nun das Spendertier spezifisch gegen A gehemmt, so wird auch das Reaktionsvermögen gegen jene genetischen Loci im  $C_3H$ -Empfängertier mitgetroffen, die mit jener des A-Codes übereinstimmen. Es können also in unserem modifizierten g-v-h-Modell

nur die vom A-Code differenten genetischen Loci des  $C_3H$ -Empfängertieres zu ungehemmter g-v-h-Reaktion führen. Es ist folglich jener von der A-Komponente genetisch differente Anteil des  $C_3H$ -Empfängertieres für die Höhe der gemessenen g-v-h-Reaktivität verantwortlich. Die in unserem Testsystem induzierte Hemmung der g-v-h-Reaktivität des Spenders kann folglich im  $C_3H$ -Empfängertier nicht so stark wie in einem Empfängertier mit der A-Komponente zum Nachweis kommen.

Somit kann der zunächst überraschende Befund, daß eine gegenüber der A-Komponente gehemmte Reaktivität auch eine verminderte Reaktivität gegenüber einer  $C_3H$ -Determinante aufweist, auf überlappende Antigene in beiden Inzuchtstämmen und nicht auf eine unspezifische T-Zellhemmung zurückgeführt werden. Eine Stützung dieser Interpretation muß durch zusätzliche Untersuchungen mit geeigneten Inzuchtkombinationen angestrebt werden.

### 3. DISKUSSION

#### 3.1. Zur graft-versus-host-Reaktion

Als Grundmodell der hier vorgestellten Untersuchungen diene die graft-versus-host-Reaktion (g-v-h-Reaktion) unter Verwendung von Inzuchtmäusen. Diese führt durch Übertragung immunkompetenter Zellen in einem genetisch differenten, immunologisch inkompetenten Organismus zur Runtkrankheit, die unter typischen Krankheitszeichen letztlich den Tod des Experimentaltieres herbeiführt. Die Verwendung von Inzuchtmäusen ist deswegen von Bedeutung, da deren  $F_1$ -Hybride die elterlichen Zellen nicht als fremd erkennen und abstoßen können. Die immunologische Inkompetenz ist auch dadurch gegeben, daß neugeborene Tiere verwendet werden. So können die injizierten Zellen gegen die differenten Antigene des Wirtes reagieren. Es handelt sich hier also um eine Transplantationsreaktion; nicht der Wirt wendet sich jedoch gegen das Inoculum, sondern dieses gegen den Wirt. Jedesmal wird vor allem das T-Zellsystem angesprochen, so daß die g-v-h-Reaktion als Modell zur Untersuchung der Transplantationsreaktion, d. h. der zellulären Immunität, in vivo dient.

Durch drei verschiedene Methoden läßt sich die Intensität der g-v-h-Reaktion quantitativ erfassen:

1. Durch Messung der Todesrate der Empfänger in zeitlicher Abhängigkeit von der Zellübertragung. Sie ist eine ungenaue Methode und erfaßt nicht alle Fälle der Runtkrankheit, da insbesondere bei schwächeren genetischen Differenzen die g-v-h-Reaktionen geringer sind und nicht alle Tiere sterben.
2. Die Beobachtung des Körpergewichts der Empfänger nach Zelltransfer, die bereits empfindlicher ist und alle Tiere erfaßt, allerdings korreliert besonders in der Frühphase der Runtkrankheit bei neugeborenen Mäusen die Größe der Gewichtsveränderung nicht genau mit der histologisch festzustellenden Intensität der Runtkrankheit.
3. Die Bestimmung der Organindices nach Simonsen. Sie erfaßt die Gewichtsveränderungen der Organe, z. B. Leber, Milz und Thymus, an denen sich die Runtkrankheit quantifizieren läßt. Sie muß zu dem Zeitpunkt der maximalen Veränderungen vorgenommen werden, da die Organe sich im späteren Krankheitsverlauf wieder zurückbilden.

Bei dieser Methode ist jedoch zu beachten, daß als Bezugsgröße für den Organindex ein Kontrolltier aus dem gleichen Wurf benutzt wird. Daraus ergibt sich, daß bei Bestimmung des Organindex nicht eine Erkrankung der gesamten Familie erfaßt wird. In diesem Fall wird auch der Index = 1 errechnet,

wie er sich für ein normales Tier ergibt (Lemmel, Zt. Imm. Forschung 1968).

Ein gewisser Nachteil der Indexmethode besteht darin, daß die Tiere zur Organbestimmung getötet werden müssen und einer weiteren Beobachtung daher nicht mehr zur Verfügung stehen.

Die g-v-h-Reaktion ist außer an Mäusen, wie hier in der vorliegenden Arbeit, auch an Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Hühnern erprobt worden, wobei der physiologische Ablauf oder die externe Beeinflußbarkeit der g-v-h-Reaktion untersucht wurden. Mäuse werden bevorzugt zur Untersuchung der genetischen Abhängigkeit innerhalb der g-v-h-Reaktion benutzt, da durch die vielfältigen, verfügbaren Inzuchtstämme unterschiedliche genetische Differenzen frei wählbar sind. Darüber hinaus erübrigt sich durch die Züchtung von  $F_1$ -Hybriden, die aus genetischen Gründen Zellmaterial der elterlichen Stämme nicht abstoßen können, eine Modifikation des Empfängertieres mit dem Ziel, die Abstoßung des Transfermaterials zu verhindern.

Die im voll allogenetischen System zur Ermöglichung einer g-v-h-Reaktion sonst notwendigen Vorbehandlungen der Empfängertiere mit chemo-, strahlen- oder zelltherapeutischen Maßnahmen sind äußerst vielfältig und hier nicht im einzelnen wiederzugeben.

Die konventionelle g-v-h-Reaktion (Übertragung elterlicher Zellen auf  $F_1$ -Hybriden) kann zum Nachweis einer therapiebedingten T-Zellhemmung verwendet werden. Hinsichtlich der immunsuppressiven Wirksamkeit von Cyclophosphamid wurde dies erstmals 1967 nachgewiesen (3). Wurden Empfänger von Milzzellen anschließend kurzzeitig mit Cyclophosphamid behandelt, so konnten sämtliche Symptome einer g-v-h-Reaktion (Mortalität, Organveränderung, verminderte Gewichtszunahme) vollständig unterdrückt werden. In analoger Weise wurden die ersten Versuche der hier vorgelegten Arbeit durchgeführt. Es stellte sich hierbei jedoch heraus, daß das neue Cyclophosphamidanalogum Asta 036.5122 im gerade noch subtoxischen Bereich die g-v-h-Reaktion nicht ausreichend hemmen konnte. Diese Beobachtung bewies den wesentlichen Nachteil dieses Versuchsansatzes, daß nämlich zwischen einer Toxizität des Pharmakons in den Jungtieren und einer letalen T-Zellreaktivität nicht unterschieden werden kann.

In der vorgelegten Arbeit werden Untersuchungen an einem modifizierten g-v-h-Modell vorgestellt, mit dessen Hilfe die oben genannten biologischen Nachteile des konventionellen g-v-h-Modells umgangen werden konnten. Der Versuch der pharmakologischen Beeinflussung einer T-Zellreaktivität wird hier in einem erwachsenen Tier vorgenommen, das gegenüber Transplantationsantigenen von definierter Differenz vorimmunisiert wurde. Die erwartete T-Zellhemmung gegen dieses

Antigen wurde dadurch untersucht, daß (zu verschiedenen Zeiten nach Vorbehandlung) Milzzellen dieser Tiere auf junge  $F_1$ -Hybride übertragen wurden, deren Elternteile einerseits der Spenderstamm, andererseits der Stamm war, dessen Zellen zur Vorimmunisierung benutzt wurde und gegen den die T-Zellreaktivität durch die Behandlung gehemmt werden sollte.

Dieses Modell bietet den Vorteil, daß die Dosierung des Pharmakons den biologischen Verhältnissen eines erwachsenen Tieres angepaßt wird und daß zudem die jungen  $F_1$ -Hybriden pharmakologisch gar nicht belastet werden, sondern anschließend zum Nachweis der g-v-h-Reaktivität dienen.

Mit Hilfe dieser Modifikation war es im Gegensatz zu den Ergebnissen des konventionellen g-v-h-Modells tatsächlich möglich, für das Versuchspräparat Asta 5122 eine ausgeprägte Hemmwirkung auf die T-Zellreaktivität nachzuweisen. Die Dauer der induzierten T-Zellhemmung wurde untersucht, diese erwies sich in ihrem Ausmaß als abhängig von der zur Vorimmunisierung des Spenders verwendeten Antigendosis.

### 3.2. Zur medikamentösen Beeinflussung

Die vorliegende Arbeit sollte auch dazu dienen, die Wirkungsweise und den Angriffspunkt von Immunsuppressiva, insbesondere des Cyclophosphamidanalogums Asta 5122, in Hinsicht auf das T-Zellsystem zu untersuchen.

Wie in der Einleitung näher erläutert, kann man davon ausgehen, daß die Immunsuppressiva in "Kooperation" mit dem Antigen "selektiv" wirken, da die Medikamente die durch das Antigen aktivierten spezifischen Lymphozyten treffen.

Inwieweit das neuentwickelte Asta 5122 in bezug auf diese Arbeitshypothese wirksam ist, wurde bisher von Lemmel 1972, Potel et al. 1973, Müller-Ruchholtz 1974 und Brock/Potel 1974 untersucht. Dabei erwies sich Asta 5122 in der Unterdrückung sowohl humoraler wie auch zellgebundener Immunreaktionen als wirksam.

In diesem Zusammenhang ist vor allem ein Vergleich mit Cyclophosphamid von Interesse, als dessen Weiterentwicklung das neue Medikament gilt. Beide wirken bevorzugt cytotoxisch, d. h. bewirken im Endeffekt eine Verminderung von langlebigen Zellen. Das sind bei der Maus die kleinen und mittleren Lymphozyten (Botzenhardt u. Lemmel, Drug Res. 24 [1974]).

Asta 5122 erwies sich bei Immunsuppression bzw. in der Induktion spezifischer immunologischer Toleranz im Vergleich mit

Cyclophosphamid als stärker wirksam (Brock: Arzneimittel-  
forschung 24, Botzenhardt/Lemmel: Arzneim. Forsch. 24 1974 . Bei  
Suppression der konventionellen g-v-h-Reaktion hingegen war  
Cyclophosphamid wesentlich wirksamer (100 % Mortalitätsver-  
hütung) und zeigte in der angewendeten therapeutischen Dosis  
keinerlei Toxizitätszeichen (Lemmel:Fol.Biol.12 1966 ). Asta 5122  
führte jedoch in eigenen Untersuchungen zu keiner Mortali-  
tätsverhütung bei subtoxischer Dosierung (3 x 20 mg/kg).  
Steigerung der Dosis erwies sich als toxisch und führte zum  
Tod der Versuchstiere (siehe Versuch 1 und 2).

Daß es sich hierbei nicht um einen Mangel an immunsuppressiver  
Wirkung handelte, sondern um einen biologischen Nachteil des  
konventionellen g-v-h-Modells, konnte, wie oben bereits aus-  
geführt, mit Hilfe des modifizierten g-v-h-Modells bewiesen  
werden (Versuch 3).

Daß diese Modifikation zum Nachweis einer T-Zellhemmung  
durch Pharmaka geeignet ist, ergaben entsprechende Vergleichs-  
untersuchungen unter Verwendung anderer Testsubstanzen.

So zeigte Cyclophosphamid seine immunsuppressive Wirkung auch  
in diesem neuen Modell: Vorbehandlung der Spender mit Antigen  
und Cyclophosphamid führte zu einer drastischen Senkung der  
g-v-h-Reaktivität, gemessen in einer vergleichsweise signi-

fikanten Verminderung der Organveränderungen im Empfänger-tier nach Transfer.

In der vorliegenden Arbeit wurde als weitere Testsubstanz Azathioprin auf seine Fähigkeit untersucht, im modifizierten g-v-h-Modell die T-Zellreaktivität der Spendertiere zu hemmen. Im Gegensatz zu Cyclophosphamid und Asta 5122 konnte für Azathioprin keine immunsuppressive Wirksamkeit auf die T-Zellreaktivität der Spendertiere gefunden werden. Dieser Befund stimmt gut mit Untersuchungen überein, in denen die immunsuppressive Potenz von Alkylantien mit denen von 6-Mercaptopurin und Azathioprin auf die Immunantwort der Maus gegenüber SRBC untersucht wurde (7). Hier erwiesen sich die Alkylantien den Antiproliferativa als deutlich überlegen. Diese vergleichsweise schwache Wirksamkeit von Azathioprin und 6-Mercaptopurin bei der Maus steht in gewissem Gegensatz zu der guten immunsuppressiven Potenz beim Kaninchen (Schwartz et al.: J. Clin. Invest. 38, 1959; Schwartz/Damashek:Nature 183, 1959).

Hier besteht offensichtlich eine Speziesunterschiedlichkeit der Wirksamkeit, die nach den Untersuchungen von Lemmel und Botzenhardt (Drug Res. 26, 1976 ) u. a. auf die unterschiedliche Proliferationskinetik der Lymphozyten in beiden Spezies zurückgeführt wird. Schnellproliferierende Zellen (Kaninchen) können im Gegensatz zu langsam proliferierenden Zellen (Maus)

von Zellteilungshemmern wie Antimetaboliten leicht getroffen werden.

Dagegen sind Alkylantien in ihrer Wirkung nicht an spezifische Stadien der Zellteilung gebunden. Sie erzielen jedoch einen besseren cytotoxischen Effekt auf die Zellen, die einen vergleichsweise gesteigerten Zellstoffwechsel haben. Dieser Umstand kann im Rahmen der Immunsuppression zugunsten einer Einengung der Wirkungselektivität genutzt werden: die Zellclone, die durch ihr spezifisches Antigen aktiviert werden, sind gegenüber dem nachfolgenden Angriff der Alkylantien vergleichsweise vulnerabler. Die gute immunsuppressive und sogar toleranzinduzierende Wirkung der Alkylantien, auch in Spezies mit langsamer Teilungsrate der Lymphozyten, kann mit dieser Deutung ausreichend erklärt werden. Dieser Interpretation entsprechen auch die in dem hier vorgelegten modifizierten g-v-h-Modell erhobenen Befunde, nach denen eine Hemmung der T-Zellreaktivität nur in einem Synergismus zwischen Antigen und Pharmakon erzielt werden konnte.

Man kann also im Sinne der vorangestellten Wirkungsweise der Immunsuppressiva für Asta 5122 auch im Vergleich zu dem verwandten Cyclophosphamid gute Wirksamkeit in der Suppression der zellulären Immunität und der Toleranzinduktion nachweisen.

### 3.3. Zur Antigen-Spezifität der T-Zellhemmung

Simonsen wies in seiner grundlegenden Arbeit von 1962 bereits darauf hin, daß die genetische Differenz der bei Mäuseversuchen benutzten Inzuchtstämme von größter Bedeutung für die Ausbildung und Stärke der g-v-h-Reaktion ist.

Verschiedene genetische Subregionen des Histokompatibilitätskomplexes sind für die Abstoßungsreaktionen von fremdem Gewebe bei der Maus verantwortlich. Den stärksten Einfluß auf eine Abstoßung hat der H2-Locus, der sich in verschiedene Subregionen K, I, S, G und D aufteilt. Diese Regionen sind ebenfalls nicht gleichberechtigt untereinander, was ihren Einfluß auf die Abstoßungsreaktion angeht. Eine Differenz des gesamten H2-Komplexes mit allen Subregionen führt zu den stärksten Reaktionen. In den vorliegenden Untersuchungen wurden zum größten Teil Inzuchtmäuse der Stämme C<sub>57</sub>Bl/6 und A benutzt, deren starke Histokompatibilität von der Differenz im H2-Locus herrührt. Dabei ist die g-v-h-Reaktion bei Übertragung von Bl-Zellen auf BlxA-F<sub>1</sub>-Hybride stärker als bei Übertragung von A-Zellen auf den gleichen Tochterstamm (Klein, 1976: Transplant. Proceedings, Vol. VIII, No. 3; Lemmel: Zeitschr. Immunitätsforschung 1967).

Die Richtung der T-Zellreaktion ist in der vorliegenden Arbeit so gewählt, daß die  $C_{57}Bl/6$ -Zellen gegen die A-Komponente in den  $BlxA-F_1$ -Hybriden reagiert. Diese Ausrichtung der T-Zellreaktion wird auch im modifizierten g-v-h-Modell nicht verändert. Sie wird einmal im Spendertier induziert und hier durch die nachfolgende Behandlung gehemmt. Sie wird zum anderen durch Transfer des Spendermaterials in  $F_1$ -Hybriden induziert, wo sie über Messung der g-v-h-Reaktion die im Spender induzierte T-Zellhemmung anzeigt.

Es wurde davon ausgegangen, daß die in diesem Modell erzielte T-Zellhemmung selektiv auf das zur Immunisierung verwendete Antigen beschränkt bleibt. Da die Reaktivität von Zellen, die gegenüber dem Stamm A gehemmt wurden, nach entsprechendem Transfer auch eine verminderte Reaktivität gegenüber  $C_3H$  zeigten (Versuch 7, Seite 54), schien diese Annahme zunächst in Frage gestellt. Die Reaktionshemmung gegenüber  $C_3H$  ist in diesem Versuch jedoch deutlich geringer als gegenüber A, so daß die "überlappende" T-Zellhemmung auch auf "überlappende", d. h. auf beiden unterschiedlichen H2-Komplexen von A und  $C_3H$  in gleicher Weise vorkommenden Subdeterminanten, zurückzuführen ist.

Diese Annahme muß durch weitere Untersuchungen unter Verwendung entsprechend gewählter genetischer Differenzen

sicherlich weiter erhärtet werden. Sie weist aber auf die attraktive Möglichkeit hin, mit Hilfe des hier gewählten Testsystems die Spezifität einer T-Zellhemmung gegenüber Subregionen des H2-Komplexes einzuengen bzw. zu quantifizieren.

Die Durchführung der hierfür notwendigen Untersuchungen war im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit nicht möglich.

#### 4. ZUSAMMENFASSUNG

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Wirkung eines neuentwickelten Immunsuppressivums, des Cyclophosphamidanalogs Asta 5122, auf die T-Zellreaktion gegen Transplantationsantigene geprüft. Als Testmodell diente die graft-versus-host-Reaktion bei Verwendung von Inzuchtmäusen und deren  $F_1$ -Hybriden.

In diesem konventionellen Modell konnte eine nur geringe Wirksamkeit von Asta 5122 sowohl in der Verzögerung der Absterberate als auch hinsichtlich der Organveränderungen nachgewiesen werden.

Asta 5122 hatte gute immunsuppressive Wirksamkeit im humoralen System gezeigt, daher waren die entsprechenden Ergebnisse auf die zelluläre Immunreaktion überraschend.

Das konventionelle g-v-h-Modell wurde daher derart modifiziert, daß die Richtung ( $A \rightarrow B$ ) der T-Zellreaktion stets die gleiche blieb wie beim konventionellen Modell. Das immunsuppressiv wirkende Pharmakon aber wurde jedoch nicht den neugeborenen, empfindlichen Empfängertieren appliziert, sondern erwachsenen Spendertieren, in denen durch entsprechende Vorimmunisierung eine T-Zellreaktion (wiederum  $A \rightarrow B$ ) induziert worden war. Diese T-Zellclone sollten durch die ent-

sprechende Behandlung gehemmt werden. Nach Übertragung des so vorbehandelten Spendermaterials auf einen geeigneten Empfänger konnte eine T-Zellreaktion in gleicher Richtung ( $A \rightarrow B$ ) als g-v-h-Reaktion ausgelöst und in ihrer Intensität gemessen werden.

Es konnte in dieser Versuchsanordnung eine gute immunsuppressive Wirksamkeit von Asta 5122 auf das T-Zellsystem festgestellt werden. Diese induzierte Verminderung der T-Zellreaktion, die durch einen Synergismus von Antigen und Immunsuppressivum erzielt werden konnte, war bis zu einer Dauer von 18 Tagen nachweisbar, bei größerem Abstand konnte keine Unterdrückung der Reaktivität gegenüber der unbeeinflussten g-v-h-Reaktion mehr festgestellt werden.

Das Ausmaß der T-Zellhemmung im Spender erwies sich als abhängig von der Größe der ihm verabfolgten Antigendosis. Azathioprin (Imurek<sup>®</sup>) zeigte im gleichen Versuchsmodell keine Wirksamkeit auf die zelluläre Immunität der Maus.

Die Antigenspezifität konnte in vorgelegten Versuchsansätzen nicht abschließend geklärt werden. Einerseits wiesen Zellen von Tieren, die gegenüber SRBC tolerant gemacht wurden, auch eine fragliche Verminderung der g-v-h-Reaktivität auf. Zum anderen führte die induzierte Reaktionsminderung gegenüber Stamm A gleichfalls zu einer Reaktionsminderung gegenüber Stamm C<sub>3</sub>H. Die überlappende Identität der Subregionen im

H<sub>2</sub>-System beider Stämme könnte eine Erklärung dieser Beobachtung sein. Eine endgültige Definition der Antigen-spezifität im vorgelegten Untersuchungsmodell kann jedoch nur unter Verwendung entsprechender Congen-resistenter Mäusestämme gelingen.

Die Ergebnisse beweisen eine gute immunsuppressive Wirkung der geprüften Testsubstanz Asta 5122 auf T-Zellreaktionen (gegenüber Transplantationsantigenen). Darüber hinaus erweist sich das vorgelegte Testmodell als gut geeignet, die immunsuppressive Wirksamkeit von Pharmaka auf die T-Zellreaktivität der Maus in vivo zu untersuchen.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Berenbaum, M. C. and Brown, J. N.  
Dose-response Relationships for Agents Inhibiting  
the Immune Response  
Immunol. 7 65-71 (1964)
- (2) Berenbaum, M. C.  
Immunosuppressive Agents  
Brit. Med. Bull. 21 140-146 (1965)
- (3) Berenbaum, M. C.  
Immunosuppressive Agents and Allogeneric Transplantation  
J. Clin. Path. 20 471-498 (1967)
- (4) Billingham, R. E. and Silvers, W. K.  
The Induction of Tolerance of Skinhomografts in Rats  
with Pooled Cells from Multiple Donors.  
J. Immunol. 83: 667 (1959)
- (5) Boranic, M.  
Treatment of Secondary Disease in Leukaemic Mice with  
Host-Type and Third-Party Haemopoietic Cells and Blood.  
Europ. J. of Clin. and Biol. Res. 3 Vol XV 309 - 314  
(1970)
- (6) Botzenhardt, U. und Lemmel, E. M.  
Cyclophosphamide-induced Immunological Tolerance:  
Revocery Leads to a Memory State.  
Folia Biologica (Praha) 21: 280-282 (1975)

- (7) Botzenhardt, U. und Lemmel, E. M.  
Comparison of the Immuno-suppressive Efficacy of  
6-Mercaptopurine, Azathioprine, Cyclophosphamide  
and O36.5122 (Asta) on the Primary and Secondary  
Immune Response of Mice to Sheep Erythrocytes.  
Agents and Actions Vol. 6/5 596-601 (1976)
- (8) Botzenhardt, U. und Lemmel, E. M.  
Immunsuppression und Toleranzinduktion durch 3-(2-  
Chloräthyl)-2-(2-mesyloxyäthylamino)-tetrahydro-  
2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid (Asta 5122).  
Arzneimittel Forsch. Drug Res. 24 Nr. 8 1167-1172  
(1974)
- (9) Botzenhardt, U. und Lemmel, E. M.  
Kinetics of the Reactive Cell Clones after Immuno-  
suppression and Induction of Tolerance:  
(1) Inhibition of 19S and 7S Plaque-Forming Cells  
in the Primary and Secondary Immune Response to Sheep  
Red Blood Cells by Cyclophosphamid and O36.5122  
(Asta)  
Agents and Action Vol. 5/5 (1975)
- (10) Botzenhardt, U., Ahr, W. und Lemmel, E. M.  
Immunsuppression durch Asta O36.5122:  
Induktion immunologischer Toleranz gegen Schaferythro-  
zyten  
Verh. Dt. Ges. Imm. Med. 80 1595 (1974)
- (11) Brock, N. und Potel, J.  
Pharmakologische Untersuchungen mit Alkylsulfonylalkyl-  
bzw. Chloräthylsubstituierten oxazaphosphorin-2-oxiden.  
2. Mitteilung: Pharmakologische Charakteristik von 2-  
Alkyl-sulfonyl-oxyalkylamino-oxazaphosphorin-2-oxiden  
unter Einbeziehung immunologischer Reaktionen.  
Arzneim. Forsch. Drug Research 24 Nr. 8 1149-1160 (1974)

- (12) Brock, N. and Kuhlmann, J.  
Pharmacological Studies with Alkylsulfonyloxyalkyl  
Substituted and Chloroethyl Substituted oxazaphos-  
phorine-2-oxides.  
1. Communication: Relationship between Chemical Struc-  
ture and Pharmacological Action.  
Arzneim. Forsch. Drug Research 24 Nr. 8 1133-1149 (1974)
- (13) Brodehl, H.-D.  
Die suppressive Wirkung von Azathioprin, Cyclophospha-  
mid und Isophosphamid auf die immunologische Sofort-  
und Spätreaktion im Tierexperiment.  
Inauguraldissertation Mainz (1971)
- (14) Brune, K.  
Zum Mechanismus einer heterologen, cutanen Graft-Versus-  
Host-Reaktion in der Maus  
Z. Ges. exp. Med. 151 74-88 (1969)
- (15) Brune, K. und Bucher, K. E.  
Zum Mechanismus einer heterologen cutanen Graft-Versus-  
Host-Reaktion in der Maus  
II. Die Bedeutung der Reaktivität von Graft und Host  
Z. Ges. exp. Med. 156 73-86 (1971)
- (16) Floersheim, G. L.  
Immunologische und pharmakologische Grundlagen für die  
Anwendung immunsuppressiver Medikamente bei Autoimmun-  
krankheiten  
Schweiz. med. Wochenschr. 100 2241 (1970)
- (17) Floersheim, G. L.  
Transplantationsbiologie  
Heidelberg 1971

- (18) Festenstein and Demant  
The Genetic Basis of Cell-mediated Reactions, in:  
The Immune System, Edts.: Hobart, M. J. and McConnell, I.  
Oxford 1975 S. 249
  
- (19) Glucksberg, H. and Fefer, A.  
Chemotherapy of Established Graft-Versus-Host-Disease  
in Mice  
Transplantation 13 No. 3 300-305 (1972)
  
- (20) Humphrey, J. and White, R.  
Kurzes Lehrbuch der Immunologie  
2. Auflage Stuttgart (1972)
  
- (21) Klein, J.  
Relative Importance of H2-Regions in the Development  
of Graft-Versus-Host-Reactions.  
Transplantation Proceedings Vol. VIII No. 3 (1976)
  
- (22) Klein, J. and Chin Lee Chiang  
Ability of H2-Regions to Induce Graft-Versus-Host-  
Disease.  
J. Immunol. 117 No. 3 (1976)
  
- (23) Lemmel, E. M.  
Untersuchungen über die Wirkungsweise immunsuppressiver  
Substanzen.  
Habilitationsschrift Mainz (1973)
  
- (24) Lemmel, E. M., Böhm, F. und Nouza, K.  
Untersuchungen zur Runt-Krankheit an Inzucht-Mäusen.  
II. Diskussion zum Simonsen-Kriterium.  
Zeitschr. für Immunitätsforschung, Allergie und klinische  
Immunologie 134 436-448 (1968)

- (25) Lemmel, E. M. und Botzenhardt, U.  
Inhibition of T-cell Activity to Transplantation  
Antigens in vivo: A Test Model for Quantitative  
Evaluation.  
European J. Immunol. 6 Nr. 5 (1976)
- (26) Lemmel, E. M. und Botzenhardt, U.  
Immunsuppressive Behandlung der Erkrankungen des rheu-  
matischen Formenkreises. Experimentelle Grundlagen für  
ein rationelles Therapiekonzept.  
Arzneim. Forsch. Drug Res. 26.7, 1281-1295 (1976)
- (27) Lemmel, E. M. und Nouza, K.  
Runt Disease as a Model of Immunosuppressive Therapy.  
Fol. Biol. 12, 253-265 (1966)
- (28) Lemmel, E. M., Nouza, K. und Böhm, F.  
Untersuchungen zur Runt-Krankheit an Inzucht-Mäusen  
I. Experimente zur Pathogenese der Runt-Krankheit.  
Zeitschr. für Immunitätsforschung, Allergie und kli-  
nische Immunologie 134 397-407 (1967)
- (29) Lemmel, E. M., Köckler, S. und Wagner, H.  
T-cell Activation to Transplantation Antigens:  
Specific Blockade of the Reactive Cell Clone.  
Vortrag Straßburg (1973): European Meeting of Immunol.
- (30) Meuwissen, H. J. and Good, R.A.  
Suppression of Graft-Versus-Host-Reaction by Mitomycin C.  
Nature 215 No. 5101 634-635 (1967)
- (31) Müller-Ruchholtz, W.  
Beeinflussung transplantations-immunologischer Reaktionen  
durch Cyclophosphamid und andere homologe Oxazaphosphorin-  
2-oxide.  
Arzneimittel Forsch. Drug Res. 24 Nr. 1160-1167 (1974)

- (32) Safford, J. W. and Tokuda, Sei  
Suppression of the Graft-Versus-Host-Reaction by Passive  
Immunization of Donor against Recipient Antigens.  
Proc. Soc. Experimental Biology and Medicine 133 651-654  
(1970)
  
- (33) Schwartz, Eisner, A. and Damashek, W.  
The Effect of 6-Mercaptopurine on Antibody Formation  
J. Clin. Invest. 38 1394-1403 (1959)
  
- (34) Schwartz, R. and Damashek, W.  
Drug Induced Immunological Tolerance  
Nature 183 1682-1683 (1959)
  
- (35) Simonsen, M.  
Graft-Versus-Host-Reactions. Their Natural History and  
Applicability as Tools of Research.  
Progress in Allergy 6 349 (1962)
  
- (36) Siskind, G. W. and Thomas, L.  
J. Exp. Med. 110 511 (1959)
  
- (37) Skinner, M. D. and Schwartz, R. S.  
Immunosuppressive Therapy (first of two parts)  
New England J. Med. 287 221 (1972)
  
- (38) Skinner, M. J. and Schwartz, R. S.  
Immunosuppressive Therapy (second of two parts)  
New England J. Med. 287 281 (1972)
  
- (39) Voisin, G. A., Kinsky, R. and Maillard, J.  
Protection against Homologous Disease in Hybrid Mice  
by Passive and Active Immunological Enhancement-Facili-  
tation.  
Transplantation 6 187-202 (1968)

- (40) Voisin, G. A. and Kinsky, R.  
Protection against Muting by Specific Treatment of  
Nemborn, Mice Followed by Increase Tolerance  
Ciba Foundation Symp. 1962 on Transplantation  
(G. E. W. Wolstenholme and M. P. Cameron, eds.)  
Little Brown Boston (1962) S. 286-326

Ich danke Herrn Professor Dr. Lemmel für die  
Stellung des Themas meiner Inauguraldissertation  
und für die stete und freundliche Betreuung während  
ihrer Fertigstellung.

Außerdem danke ich Herrn Professor Dr. Berger  
für die Ratschläge im statistischen Bereich.

## LEBENS LAUF

Am 31. August 1949 wurde ich als zweites Kind des Arztes für Neurologie und Psychiatrie Dr. Johannes Rödger und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Heilgendorff in Markkleeberg bei Leipzig geboren. 1950 übersiedelten wir nach Berlin (West). 1956 wurde ich in die Tews-Grundschule in Berlin-Schlachtensee eingeschult und wechselte 1962 zum Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium in Berlin-Dahlem über. Dort bestand ich am 6. 2. 1969 die Reifeprüfung.

Zum WS 1969/70 begann ich das Medizinstudium an der Freien Universität Berlin und legte am 21. 8. 1970 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 21. 3. 1972 die ärztliche Vorprüfung ab. Zum SS 1972 wechselte ich zur Johannes-Gutenberg-Universität Mainz. Dort bestand ich am 24. 6. 1975 die ärztliche Prüfung mit der Note "gut".

Die Medizinalassistentenzeit absolvierte ich zum einen von Januar bis März 1976 an der Hautklinik der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, des weiteren von April bis August 1976 und März bis April 1977 an der 1. Medizinischen Klinik A der Universität Düsseldorf und vom August bis Dezember 1976 an der Chirurgischen Klinik der Universität Düsseldorf. Seit dem 1. 7. 1977 bin ich als Assistenzärztin (wiss. Angest.) an Institut und Klinik für Medizinische Strahlenkunde tätig (Direktor: Prof. Dr. H. Vieten).

Am 5. 3. 1973 heiratete ich den Diplom-Mathematiker Norbert Köckler. Am 25. 7. 1973 wurde unser Sohn Sebastian geboren.





